

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**



***DOTTORATO DI RICERCA  
IN AGROBIOLOGIA & AGROCHIMICA***

**INDIRIZZO PATOLOGIA VEGETALE  
XXII CICLO**

**MICRORGANISMI BENEFICI UTILIZZATI  
SIA PER LA LOTTA BIOLOGICA SIA PER  
IL BIORISANAMENTO**

**Tutor e Coordinatore  
Prof. MATTEO LORITO**

**Dottorando  
Dott.ssa VERONICA ALOJ**

**Co-tutore  
Dott. FRANCESCO VINALE**

# INDICE

---

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1. <u>Microrganismi e biorisanamento</u></b>	<b>2</b>
1.1.1. La contaminazione ambientale	2
1.1.2. Gli inquinanti	4
1.1.3. Inquinamento del suolo	5
1.1.4. Ruolo dei microrganismi nel biorisanamento di siti contaminati da idrocarburi	7
1.1.5. Tecnologie di bonifica dei siti contaminati	10
1.1.5.1. <i>Trattamenti chimico-fisici</i>	12
1.1.5.2. <i>Trattamenti termici</i>	16
1.1.5.3. <i>Trattamenti biologici o biorisanamento</i>	17
<b>1.2. <u>Microrganismi e lotta biologica</u></b>	<b>24</b>
1.2.1. La lotta biologica in patologia vegetale	24
1.2.1.1. <i>Contenimento della popolazione del patogeno</i>	25
1.2.1.2. <i>Resistenza della pianta ospite</i>	25
1.2.1.3. <i>Microrganismi benefici ed agenti di biocontrollo</i>	27
1.2.1.4. <i>Meccanismi di azione degli agenti di biocontrollo</i>	31
1.2.2. Prodotti commerciali utilizzati nella lotta biologica	34
<b>1.3. Microrganismi oggetto di indagine utili per il biocontrollo o il biorisanamento</b>	<b>37</b>
1.3.1. <u><i>Trichoderma spp.</i></u>	37
1.3.2. <u><i>Drechslera spp.</i></u>	42
1.3.3. <u>Ceppi batterici isolati da siti contaminati dal Metil tert-butil etere</u>	43
<b>1.4. Scopo della tesi</b>	<b>49</b>

<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>51</b>
<b>2.1. Ceppi utilizzati</b>	<b>51</b>
<b>2.2. Terreni di coltura</b>	<b>52</b>
<b>2.3. <u>Ceppi batterici</u></b>	<b>53</b>
<b>2.3.1. Isolamento di ceppi batterici da siti contaminati da idrocarburi</b>	<b>53</b>
<b>2.3.2. Identificazione fenotipica e molecolare</b>	<b>54</b>
<b>2.3.2.1. <i>Identificazione fenotipica di ceppi batterici</i></b>	<b>54</b>
<b>2.3.2.1.1. <i>Colorazione di Gram</i></b>	<b>54</b>
<b>2.3.2.1.2. <i>Saggio della catalasi</i></b>	<b>55</b>
<b>2.3.2.2. <i>Estrazione del DNA e PCR</i></b>	<b>55</b>
<b>2.3.3. Crescita di ceppi batterici in presenza di MtBE e degradazione dell'inquinante</b>	<b>56</b>
<b>2.3.4. Saggi di antagonismo <i>in vitro</i> nei confronti di funghi fitopatogeni</b>	<b>57</b>
<b>2.3.5. Saggi di biocontrollo <i>in vivo</i> nei confronti dei patogeni fogliari <i>B. cinerea</i> e <i>A. alternata</i></b>	<b>57</b>
<b>2.3.6. Saggi di biocontrollo <i>in vivo</i> nei confronti del patogeno terricolo <i>P. ultimum</i></b>	<b>58</b>
<b>2.3.7. Saggi di Induzione di Resistenza (ISR)</b>	<b>58</b>
<b>2.3.8. Isolamento e caratterizzazione dei metaboliti secondari prodotti dai ceppi batterici selezionati</b>	<b>59</b>
<b>2.3.9. Saggi di antibiosi <i>in vitro</i> nei confronti di funghi fitopatogeni</b>	<b>60</b>
<b>2.4. <u>Drechslera spp.</u></b>	<b>61</b>
<b>2.4.1. Estrazione del DNA dal ceppo 678 di <i>Drechslera</i> spp.</b>	<b>61</b>
<b>2.4.2. Amplificazione tramite PCR</b>	<b>61</b>
<b>2.4.3. Crescita di <i>Drechslera</i> spp. in presenza di MtBE e degradazione dell'inquinante</b>	<b>63</b>
<b>2.4.4. Saggi di antagonismo <i>in vitro</i> nei confronti di funghi</b>	

fitopatogeni	63
2.4.5. Saggi di biocontrollo <i>in vivo</i> nei confronti di patogeni terricoli	64
2.4.6. Isolamento e caratterizzazione dei metaboliti secondari prodotti dal ceppo 678 di <i>Drechslera</i> spp.	64
2.4.7. Saggi di antibiosi <i>in vitro</i> nei confronti di funghi fitopatogeni	65
2.5. <u><i>T. harzianum</i> ceppo T22</u>	66
2.5.1. Crescita di <i>T. harzianum</i> ceppo T22 in presenza di MtBE e degradazione dell'inquinante	66
 3. RISULTATI	 67
3.1. <u>Ceppi batterici</u>	67
3.1.1. Identificazione fenotipica e molecolare di ceppi batterici isolati da siti contaminati da idrocarburi	67
3.1.2. Crescita di ceppi batterici in presenza di MtBE e degradazione dell'inquinante	69
3.1.3. Saggi di antagonismo <i>in vitro</i> nei confronti di funghi fitopatogeni	74
3.1.4. Saggi di biocontrollo <i>in vivo</i> nei confronti dei patogeni fogliari <i>B. cinerea</i> e <i>A. alternata</i>	75
3.1.5. Saggi di biocontrollo <i>in vivo</i> nei confronti del patogeno terricolo <i>P. ultimum</i>	77
3.1.6. Saggi di Induzione di Resistenza (ISR)	79
3.1.7. Isolamento e caratterizzazione dei metaboliti secondari prodotti dai ceppi batterici selezionati	81
3.1.8. Saggi di antibiosi <i>in vitro</i> nei confronti di funghi fitopatogeni	84
3.2. <u><i>Drechslera</i> spp. ceppo 678</u>	85
3.2.1. Caratterizzazione di <i>Drechslera</i> spp. ceppo 678	85
3.2.2. Crescita di <i>Drechslera</i> spp. in presenza di MtBE e	

degradazione dell'inquinante	87
3.2.3. Saggi di antagonismo <i>in vitro</i> nei confronti di funghi fitopatogeni	89
3.2.4. Saggi di biocontrollo <i>in vivo</i> nei confronti di patogeni terricoli	90
3.2.5. Isolamento e caratterizzazione dei metaboliti secondari prodotti dal ceppo 678 di <i>Drechslera</i> spp.	91
3.2.6. Saggi di antibiosi <i>in vitro</i> nei confronti di funghi fitopatogeni	95
3.3. <u><i>T. harzianum</i> ceppo T22</u>	98
3.3.1. Crescita di <i>T. harzianum</i> ceppo T22 in presenza di MtBE	98
3.3.2. Degradazione del MtBE ad opera di <i>T. harzianum</i> ceppo T22	99
 4. DISCUSSIONE	 102
5. BIBLIOGRAFIA	110
6. RINGRAZIAMENTI	132

# 1. INTRODUZIONE

---

I microrganismi sono largamente diffusi in natura: essi si trovano in grande quantità nel suolo, nelle acque, nelle piante, nell'aria, nei cibi e, inoltre, sono ospiti abituali delle superfici esterne ed interne del corpo umano ed animale. La maggioranza dei microrganismi noti è utile, se non addirittura necessaria, alla vita degli uomini.

Il più alto numero di microrganismi che coabitano con l'uomo si trovano nel tratto gastro-intestinale, dove le specie batteriche maggiormente rappresentate appartengono ai generi *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus*.

I microrganismi sono ampiamente utilizzati in vari settori industriali (alimentare, farmaceutico, tessile, etc.), nel risanamento di siti altamente inquinati, in agricoltura, etc.

Nel campo alimentare i microrganismi svolgono un ruolo chiave nella produzione di numerosi prodotti, dai salumi ai formaggi, dalle bevande fermentate ai prodotti da forno, contribuendo spesso in maniera determinante alle caratteristiche di tipicità e peculiarità dei singoli alimenti. Tra gli esempi più rinomati possiamo citare i microrganismi appartenenti ai generi *Streptococcus* e *Lactobacillus*, che sono comunemente utilizzati come colture starter di prodotti lattiero-caseari ed i lieviti, in particolare *Saccharomyces cerevisiae*, fondamentali nella preparazione dei prodotti da forno.

Molti funghi e batteri (oltre 10000 ceppi microbici) sono stati isolati dal terreno ed utilizzati dalle industrie farmaceutiche per la produzione di sostanze antibiotiche. Tra i maggiori produttori di antibiotici ricordiamo *Penicillium* spp. (penicillina), *Bacillus brevis* (gramicidina e tirocidina), *Streptomyces* spp. (streptomicina, eritromicina, cloramfenicolo, kanamicina, etc.), *Cephalosporium* spp. (cefalosporine), *Nocardia orientalis* (vancomicina), etc.

Fondamentale è anche il ruolo che i microrganismi svolgono in agricoltura. Le malattie causate da stress di natura biotica rappresentano una delle più importanti cause di perdita di produzione, sia su piccola scala che a livello mondiale, con gravi conseguenze economiche e sociali. I metodi tradizionali usati per proteggere le colture dalle fitopatie sono principalmente basati sull'uso di prodotti chimici di sintesi, i cosiddetti pesticidi, i

quali possono avere drastici effetti sull'ambiente e sulla salute dei consumatori. Per tali motivi, negli ultimi decenni, si è assistito ad un incremento delle attività di ricerca e sviluppo nel campo dell'agricoltura sostenibile. L'impiego di microrganismi come possibile alternativa all'utilizzo di presidi fitosanitari sintetici rappresenta oggi un importante fattore di sviluppo nel settore agricolo. Numerose specie di funghi e batteri sono utilizzati come bioprotettori, biostimolanti e biofertilizzanti per promuovere la crescita e lo sviluppo delle piante, offrendo nel contempo anche un aumento della resistenza nei confronti di agenti fitopatogeni, nematodi ed erbe infestanti. Attualmente sono disponibili sul mercato circa un centinaio di formulati a base di funghi, batteri o lieviti antagonisti, legalmente registrati ed utilizzabili come biofitofarmaci. Tra gli antagonisti più frequentemente usati a questo scopo vi sono batteri appartenenti ai generi *Bacillus*, *Actinomyces*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* e funghi dei generi *Trichoderma* e *Gliocladium*.

Grazie alla loro capacità di adattarsi a condizioni ambientali molto estreme, funghi, batteri e lieviti, vengono impiegati anche per la bonifica di siti contaminati. La mancanza di leggi adeguate per la tutela ambientale e l'uso incontrollato di materie plastiche, fertilizzanti, fitofarmaci, combustibili e solventi hanno provocato la diffusione e l'accumulo di tali sostanze nelle matrici naturali (suolo, sottosuolo, atmosfera, acque superficiali e sotterranee), causando danni anche alla salute umana.

## **1.1. Microrganismi e biorisanamento**

### **1.1.1. La contaminazione ambientale**

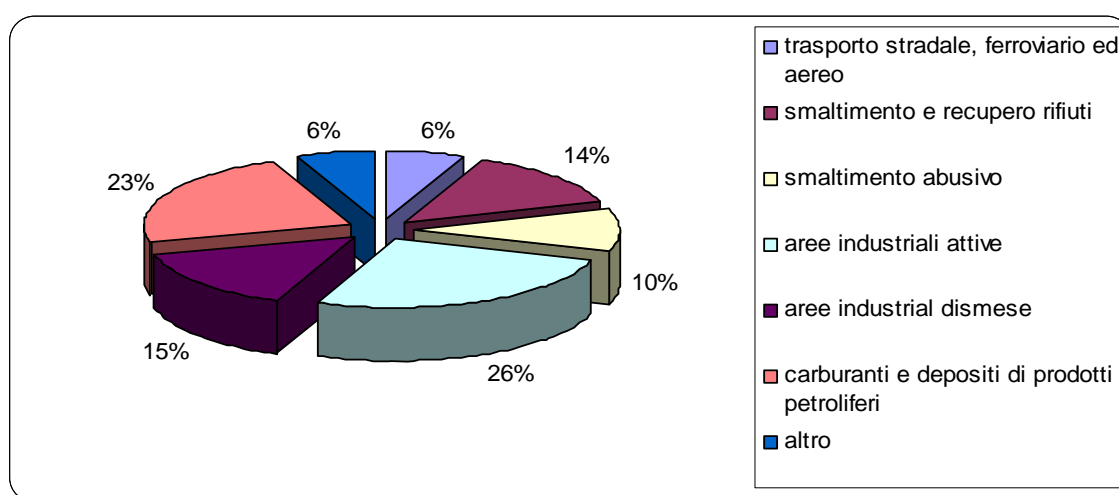
La contaminazione ambientale può essere definita come *“la conseguenza di un'azione umana capace di modificare le proprietà delle condizioni o la disponibilità o qualità delle risorse in un determinato intervallo di spazio e di tempo”* (Vighi e Bacci, 1998). La contaminazione diviene inquinamento *“quando raggiunge un livello tale da provocare effetti negativi sugli organismi, le popolazioni, gli ecosistemi”* (Vighi e Bacci, 1998). I processi di inquinamento ambientale possono essere sia di origine naturale sia artificiale: i primi sono associabili a fenomeni di decadimento di materiali, di combustioni naturali e di processi eruttivi, mentre i secondi sono strettamente legati all'industrializzazione. Con il trascorrere degli anni tali problemi sono cresciuti di pari

passo all'aumento della popolazione, alla crescita industriale ed alla notevole differenziazione dei processi produttivi.

Tutti i paesi del mondo hanno dovuto prendere atto dell'esistenza di problemi quali l'inquinamento dell'aria, delle acque e dei suoli, le piogge acide, le specie in pericolo, i cambiamenti climatici, i rifiuti pericolosi, la deforestazione. Nonostante ciò, le attività produttive continuano a rilasciare nell'ambiente sostanze di varia natura con conseguenti rischi di contaminazione del suolo, del sottosuolo, delle acque superficiali e di falda (Ministero dell'Ambiente, 2003).

Inizialmente la percezione della contaminazione dell'ambiente e del territorio nei paesi industrializzati era generalmente associata agli incidenti, con conseguenze difficilmente valutabili. La risposta politica che ne è derivata è stata rivolta ad ottenere il massimo controllo dei rischi. A partire dagli anni '90, invece, la presa di coscienza collettiva di quanto la qualità dell'ambiente fosse peggiorata ha incrementato la richiesta di tecnologie di bonifica ambientale efficaci, sicure e a costi contenuti.

Buona parte dei casi di contaminazione avviene nelle aree industriali, siano esse attive (26%) o dismesse (15%). Altre cause di inquinamento sono connesse alle attività di smaltimento e recupero rifiuti, siano esse autorizzate (14%) o abusive (10%), sono attribuibili a perdite di serbatoi interrati (23%) o sono derivate da sversamenti accidentali dovuti ad incidenti stradali, ferroviari o aerei (6%) (Figura 1).



**Figura 1.** Principali cause di inquinamento in Italia (Fonte: ARPA Piemonte, 2002).



Le principali conseguenze dell'inquinamento ambientale ricadono ovviamente sulla salute umana, ma non meno nocivi sono gli effetti sugli equilibri degli ecosistemi, sulla catena agro-alimentare, sul paesaggio, sui suoli di interesse agrario e sulla biodiversità. Infatti, è stato dimostrato che si riduce il numero delle specie, non solo animali e vegetali, ma anche e soprattutto microbiche, in grado di sopravvivere in un ambiente inquinato (Øvreås *et al.*, 1998). In questo modo il sito contaminato diventa sempre più vulnerabile alle esposizioni di altre pressioni sia antropiche sia naturali (Sorlini, 2005).

### **1.1.2. Gli inquinanti**

Le sostanze che recano maggiori danni all'ambiente non sono composti di origine naturale, ma chimica (xenobiotici). Infatti, i microrganismi sono in grado di riconoscere e rimuovere completamente le molecole sintetizzate per via biologica, mentre non possiedono gli enzimi degradativi necessari per catabolizzare i composti xenobiotici che, pertanto, permangono a lungo nell'ambiente. Talvolta queste sostanze presentano una struttura simile a quella di un composto naturale e, dunque, possono essere impiegati dai microrganismi come substrati e completamente metabolizzati. In alcuni casi, però, i composti xenobiotici possono essere solo parzialmente degradati; questa degradazione incompleta può portare alla polimerizzazione o alla sintesi di composti ancora più complessi del composto iniziale.

In alcuni casi i composti xenobiotici possono essere degradati esclusivamente in cometabolismo. Questo processo si realizza quando un microrganismo possiede un enzima che casualmente riconosce come substrato il composto. Tale trasformazione, tuttavia, è solo parziale e il microrganismo non trae alcun vantaggio da essa. La trasformazione è effettuata solamente quando il microrganismo cresce sfruttando un substrato diverso. Lo xenobiotico può così essere trasformato in un prodotto secondario che può talvolta rappresentare una fonte di carbonio ed energia per altri microrganismi (Atlas e Bartha, 1997).

Diversi composti organici di sintesi che inquinano l'ambiente sono tossici e/o cancerogeni. Secondo una classifica elaborata dall'EPA (*Environmental Protection Agency*) tra i composti più pericolosi che si possono trovare nell'ambiente sono elencati 31 cloroalifatici, 26 pesticidi, 17 idrocarburi policiclici aromatici (IPA), 15 composti cloroaromatici, 13 composti aromatici semplici, 13 composti azotati ai quali vanno

aggiunti 13 metalli (Mohammed *et al.*, 1996). Le normative entrate in vigore negli ultimi anni non solo tendono a porre limiti all'inquinamento, ma prescrivono anche di effettuare interventi di bonifica degli ambienti contaminati con lo scopo di portare la concentrazione degli inquinanti al di sotto di soglie ben definite (Sorlini, 2005).

### **1.1.3. Inquinamento del suolo**

Le attività umane, le pratiche agricole inadeguate, la proliferazione urbana ed industriale sono causa del continuo degrado del suolo il cui inquinamento è causa di gravi conseguenze per la salute e l'ambiente. Esso, infatti, incide sulla salute dei cittadini e sulla sicurezza dei prodotti destinati all'alimentazione umana e animale. Inoltre, ha ripercussioni dirette sulla qualità delle acque e dell'aria, sulla biodiversità e sui cambiamenti climatici.

L'inquinamento nelle zone urbane e industriali si verifica in conseguenza dello smaltimento di reflui scarsamente depurati, o non depurati affatto, e al deposito di materiali di scarto contenenti prodotti chimici. Un'altra possibile causa di alterazione dei suoli si ha quando le discariche di rifiuti solidi non sono state predisposte secondo i dettami della legge. Una conseguenza importante dell'inquinamento dei suoli consiste nel potenziale pericolo di contaminazione delle acque profonde in conseguenza del percolamento di sostanze presenti nei rifiuti o formatesi durante il loro stoccaggio.

Gli agenti di contaminazione del suolo possono essere organici ed inorganici. Tra le classi di inquinanti organici di maggiore importanza si ricordano: composti cloroalifatici (come il tricloroetilene, forse l'inquinante più diffuso tra i solventi industriali, molto stabile, tossico, cancerogeno), idrocarburi policiclici aromatici (IPA, notoriamente cancerogeni), cloroaromatici (per esempio i PCB, policlorobifenili, tra cui la diossina), aromatici volatili (indicati con la sigla BTEX, Benzene Toluene Etilbenzene Xilene), alifatici volatili (derivati del petrolio, non fra i più tossici), fenolici e azotati. Sono considerati contaminanti organici anche la maggior parte dei fitofarmaci. Queste sostanze vengono impiegate in agricoltura per aumentare le rese di produzione o per preservare i prodotti durante le fasi dell'immagazzinamento e della distribuzione commerciale (Foschi *et al.*, 1985). I fitofarmaci vengono introdotti nell'ambiente mediante trattamenti agricoli, utilizzazioni domestiche ed attività industriali; la loro immissione avviene sotto forma gassosa, liquida o come polveri solubili. In base agli

organismi bersaglio, questi prodotti vengono distinti in erbicidi, fungicidi, insetticidi, etc. Nell'ambito di ciascun gruppo di fitofarmaci è possibile un'ulteriore classificazione in base alla natura chimica dei composti (ditiocarbammati, tioftalimmidi, benzimidazoli, dicarbossimidi, etc). Oggi sono disponibili oltre 500 prodotti attivi con più di 55.000 formulati commerciali (Viggiani, 1994).

Se da un lato queste sostanze hanno contribuito, dal dopoguerra ad oggi, al contenimento delle perdite di produzione ed all'ottenimento di prodotti di migliore qualità, dall'altro un loro uso prolungato è stato causa di molti effetti negativi.

Sempre più evidenti, infatti, risultano i danni per la salute e per l'ambiente sia in termini di accumulo di residui tossici e cancerogeni nel tessuto adiposo di uomini e animali, che di avvelenamento dei suoli, delle acque sotterranee e di superficie. Inoltre, con il passare del tempo, sono stati osservati anche fenomeni di resistenza dei parassiti agli stessi fitofarmaci.

I rischi per gli uomini e gli animali derivanti dal contatto o l'assunzione di questi prodotti di sintesi sono molteplici e di varia natura. Naturalmente i più esposti a rischio sono gli operai addetti alla produzione dei pesticidi, gli agricoltori che li impiegano ed in ultimo noi consumatori.

La penetrazione nell'organismo dei fitofarmaci può avvenire attraverso la pelle, l'apparato digerente o l'apparato respiratorio e può causare conseguenze pressoché immediate (effetti acuti) o anche molto ritardate nel tempo (effetti cronici). L'intossicazione acuta si manifesta con irritazioni cutanee, nausea, disturbi alla visione ed altri squilibri del sistema nervoso; nei casi più gravi può portare anche alla morte.

Riguardo agli inquinanti inorganici nei terreni, invece, questi si identificano sostanzialmente con i metalli pesanti. Essi sono naturalmente presenti nelle rocce, nel suolo e nelle piante ma, negli ultimi decenni, l'inquinamento ad opera di tali elementi è diventato uno dei maggiori problemi ambientali nei paesi industrializzati ed in via di sviluppo in quanto responsabili di gravi effetti sulla salute umana e sull'ambiente.

I metalli pesanti, così come altri elementi tossici, possono essere dispersi nell'ambiente direttamente dall'industria durante alcuni processi produttivi (industrie minerarie che li estraggono dal sottosuolo), oppure dal consumatore quando utilizza prodotti che li contengono (ad esempio vernici, pneumatici, combustibili, etc). Tra i metalli pesanti cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), rame (Cu) presente in alcuni fitofarmaci inorganici, mercurio (Hg), manganese (Mn), nichel (Ni), piombo (Pb), zinco (Zn), molibdeno (Mo) e stagno (Sn) sono considerati i più importanti inquinanti del suolo. Ad

essi vanno aggiunti anche alcuni metalloidi quali arsenico (As), bismuto (Bi) e selenio (Se). Essi, infatti, sono molto diffusi, tossici e persistenti, ovvero hanno la caratteristica di rimanere in circolo nell'ambiente (ad es. attraverso la catena alimentare) per molto tempo.

E' stato stimato che dalla fine del XIX secolo ad oggi le concentrazioni di Pb, Zn, Cd e Cu siano aumentate anche del 10% negli strati superficiali del suolo (Renella, 2004). Questi elementi, assieme ad As, Cr, Hg e Ni possono essere ritenuti i più diffusi come inquinanti; il Mn, peraltro relativamente abbondante nel terreno in condizioni naturali, è un agente di contaminazione abbastanza diffuso (Radaelli e Calamai, 2001).

Alcuni metalli pesanti, però, risultano importanti per la vita dei microrganismi (Weast, 1984). Ferro (Fe), Cu, Zn, Cr, Mn, Ni e Co hanno, ad esempio, un importante ruolo fisiologico: in piccole concentrazioni sono essenziali per animali e piante ma, ad elevate concentrazioni, possono dar luogo a fenomeni di tossicità per gli organismi viventi ostacolando lo svolgimento di determinate funzioni vitali della cellula, non essendo gli organismi spesso in grado di eliminarli dal loro interno.

Gli effetti nocivi sulla salute dell'uomo sono strettamente legati alla natura chimica del contaminante, la modalità di esposizione, la quantità di contaminante presente, la durata dell'esposizione e fattori genetici individuali.

L'esposizione a molti dei contaminanti menzionati può essere causa di un aumento dell'incidenza di tumori, danni a reni, fegato e sistema nervoso centrale.

#### **1.1.4 Ruolo dei microrganismi nel biorisanamento di siti contaminati da idrocarburi**

Nel corso degli anni, un numero sempre maggiore di autori (Atlas e Bartha, 1997; Juck *et al.*, 2000; Bundy *et al.*, 2002) ha studiato l'effetto della contaminazione da idrocarburi sulla comunità microbica che ha dimostrato di svolgere un ruolo chiave nel metabolismo delle sostanze organiche sia nel terreno sia nelle acque sotterranee.

La concentrazione dei microrganismi capaci di degradare le sostanze inquinanti nel terreno sembra diminuire con la profondità a causa della forte pressione selettiva e delle condizioni estremamente sfavorevoli del suolo (Maila *et al.*, 2005). Al contrario, nei terreni superficiali c'è una maggiore varietà di nutrienti che consentono il rapido

sviluppo di una carica microbica in grado di degradare più velocemente e meglio le sostanze inquinanti.

In suoli o acque contaminate da composti derivati dal petrolio sono state individuate numerose popolazioni microbiche appartenenti a diversi generi (Sarkhoh *et al.*, 1999). La degradazione del petrolio e dei suoi derivati sembra coinvolgere microrganismi sia eucarioti che procarioti, tra cui ricordiamo *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Candida* e *Sporobolomyces* (Atlas, 1981; Sarkhoh *et al.*, 1990).

Ciascun microrganismo, tuttavia, è generalmente in grado di degradare soltanto un range ristretto di substrati idrocarburici; per questo risulta fondamentale la costituzione di idonei consorzi microbici in grado di condurre ed estendere il tasso di degradazione con un ampio spettro enzimatico. Un esempio dell'importanza della sinergia tra i microrganismi degradatori è riportato da Ghazali *et al.* (2004), i quali hanno studiato l'attività di due consorzi microbici costituiti da ceppi appartenenti ai generi *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Micrococcus*, noti in letteratura per le loro capacità di crescere e di utilizzare gli idrocarburi come unica fonte di carbonio (Annweiler *et al.*, 2000; Ijah e Antai, 2003; Mishra *et al.*, 2001; Whyte *et al.*, 1997).

Altri studi sono stati effettuati prendendo in considerazione singoli microrganismi (Gallego *et al.*, 2001), come alcune specie del genere *Acinetobacter*, risultato essere uno dei più efficienti degradatori di idrocarburi del gasolio e in grado di utilizzare una gran varietà di fonti di carbonio incluso benzine, idrocarburi aromatici e composti diossina-correlati (Cerniglia, 1992; Amund, 1996; Lal e Khanna, 1996; Halden e Dwyer, 1997; Alexander, 1999; Yuste *et al.*, 2000).

Un importante fattore che condiziona la biodegradazione di inquinanti organici è rappresentato dal potenziale di ossido-riduzione che si stabilisce nella matrice contaminata. Nella maggior parte dei casi, soprattutto in presenza di idrocarburi, il metabolismo microbico ossidativo (quello cioè che impiega l'ossigeno come accettore finale di elettroni) si è rivelato il più efficace per la degradazione. In carenza di ossigeno, è fondamentale l'azione svolta dai microrganismi anaerobi che si sono dimostrati in grado, quantomeno, di trasformare le sostanze inquinanti in modo tale da renderle più suscettibili al successivo attacco per via ossidativa. In questi casi si possono instaurare processi in cui vengono utilizzati come accettori di elettroni i nitrati, il  $Mn^{4+}$ , il  $Fe^{3+}$ , i solfati e l'anidride carbonica.

I microrganismi, però, spesso sono responsabili soltanto di una parziale degradazione delle molecole organiche inquinanti. Talvolta le reazioni metaboliche a carico delle sostanze organiche di partenza possono portare alla formazione di composti intermedi che altre specie microbiche possono riconoscere come substrato di crescita. In alcuni casi poi le reazioni di biotrasformazione portano alla formazione di composti più tossici delle molecole di partenza.

Tra gli enzimi maggiormente implicati nei processi biodegradativi aerobici dei composti xenobiotici troviamo le monoossigenasi e le diossigenasi. Le monoossigenasi sono prodotte sia da funghi che da batteri, mentre le diossigenasi sono prodotte esclusivamente da batteri.

Diversi studi hanno evidenziato che molti microrganismi riescono a degradare gli idrocarburi anche grazie alla produzione di biosurfattanti (lipopeptidi, glicolipidi, polisaccaridi, proteine, lipopolisaccaridi, lipoproteine o miscele complesse di questi biopolimeri) di diversa natura chimica e peso molecolare (Rosenberg, 1983). E' stato dimostrato che la produzione di emulsionanti ad alto e basso peso molecolare è indotta da segnali molecolari e si verifica in concomitanza con l'aumento di densità cellulare e all'inizio della fase stazionaria di crescita (Van Delden *et al.*, 1998).

Sono stati inoltre studiati gli effetti di alcuni surfattanti di origine non biologica sul biodegradamento. L'aggiunta di Tergitol NP-10 ha favorito la dissoluzione di fenantrene e ha permesso un maggior tasso di crescita di un ceppo di *P. stutzeri* (Grimberg, 1996). Lo stesso effetto è stato causato dal Tween 80 su ceppi di *Sphingomonas*, mentre ha inibito la degradazione del fenantrene da parte di alcuni ceppi di *Mycobacterium* (Willumsen, 2001). Altre volte, infine, i surfattanti non biologici non hanno causato alcun effetto sui microrganismi.

### **1.1.5. Tecnologie di bonifica dei siti contaminati**

L'uso eccessivo di prodotti chimici di sintesi (materie plastiche, fertilizzanti, fitofarmaci, combustibili, solventi, etc.) e l'assenza di leggi adeguate in termini di tutela ambientale non hanno fatto altro che aumentare considerevolmente il numero di siti contaminati. Per rimediare ai danni provocati in passato e salvaguardare l'ambiente, negli ultimi anni si è sviluppata un'intensa attività di ricerca volta a perfezionare le tecniche di bonifica a disposizione sul mercato.

La scelta di una tecnica piuttosto che di un'altra è strettamente legata alla conoscenza delle caratteristiche geologiche e idrologiche del sito da bonificare, l'estensione dell'area inquinata, i volumi di suolo contaminato, il grado di inquinamento delle diverse matrici ambientali e la distribuzione spaziale delle sostanze tossiche nel sito, nonché le vie di esposizione e le caratteristiche della popolazione su cui possono manifestarsi gli effetti dell'inquinamento.

La scelta della tecnica ottimale varia anche in base alla natura intrinseca delle stesse (si varia da tecniche chimico-fisiche classiche a tecniche microbiologiche), ai tempi di realizzazione, agli effetti secondari di impatto ambientale, ai costi e alle normative relative a quella particolare area.

Secondo il D. Lgs. 152/2006, bisogna distinguere le tecniche di messa in sicurezza permanente dagli interventi di bonifica.

Nel caso della messa in sicurezza permanente i contaminanti non vengono eliminati bensì si cerca di impedire la loro diffusione nelle matrici ambientali circostanti, minimizzando i loro possibili effetti su potenziali recettori. Pertanto, con la messa in sicurezza, il sito rimane contaminato e non può essere riconvertito a nessun uso. Questa tipologia di intervento è solitamente utilizzata per tutti quei casi (ad es. discariche) in cui possa risultare inefficace o estremamente costosa qualsiasi tecnica di bonifica.

Per bonifica, invece, si intende l'eliminazione delle fonti d'inquinamento o la riduzione delle concentrazioni delle sostanze inquinanti al di sotto dei valori limite previsti per la destinazione d'uso a cui si intende riconvertire quel sito. Questa tipologia di intervento richiede l'applicazione di tecnologie di trattamento del suolo, del sottosuolo e degli acquiferi sotterranei classificabili in:

- trattamenti chimico-fisici,
- trattamenti termici,
- trattamenti biologici.

Le tecnologie di bonifica e/o di messa in sicurezza possono essere distinte in:

- interventi *in-situ*,
- interventi *ex-situ* a loro volta suddivisi in:
  - interventi *on-site*,
  - interventi *off-site*.

Gli interventi *in-situ* permettono di decontaminare le aree di interesse senza rimuovere il suolo o le acque da bonificare. Queste tecnologie risultano vantaggiose da un punto di vista economico, ma sono sconsigliate qualora il rischio legato alla contaminazione ed alla sua probabile diffusione sia molto elevato. I limiti di questi sistemi consistono nella difficoltà di controllare in maniera efficace le reazioni degradative e, inoltre, sono da prevedere tempi di trattamento molto lunghi.

Si ricorre agli interventi *ex-situ* qualora i metodi *in-situ* non siano in grado di garantire livelli di degradazione soddisfacenti oppure quando, a causa delle particolari caratteristiche della matrice contaminata o dell'elevata concentrazione degli inquinanti, si rendano necessari l'escavazione e il successivo trattamento del terreno contaminato o l'estrazione in superficie delle acque di falda inquinate. Tali interventi possono avvenire *on-site* nel momento in cui il trattamento dei materiali estratti avvenga nell'area del sito stesso, oppure *off-site* nel caso in cui i materiali vengano inviati in impianti di trattamento autorizzati o in discariche esterne al sito.

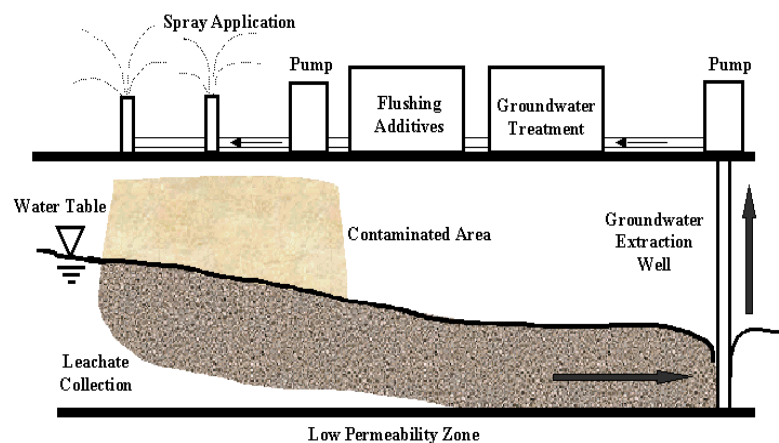


### 1.1.5.1. Trattamenti chimico-fisici

I trattamenti chimico-fisici generalmente presentano la maggiore efficienza di rimozione dei contaminanti in tempi di bonifica relativamente brevi; tuttavia sono anche i più costosi e causano lo stravolgimento delle caratteristiche biotiche, chimiche e fisiche del sito da bonificare.

Tra i principali trattamenti di tipo chimico-fisico di bonifica dei siti contaminati si ricordano:

- **Soil flushing (*in-situ*)**: consiste nel lavaggio del terreno mediante acqua o soluzioni in grado di estrarre e immobilizzare i contaminanti presenti nel suolo. Le soluzioni vengono immesse nel terreno mediante opportuni sistemi di irrigazione o di iniezione (bacini o trincee di infiltrazione, pozzi, irroratori) mentre l'estrazione della soluzione esausta (arricchita di contaminanti) avviene grazie a pozzi di captazione dotati di pompa. La soluzione contaminata, una volta portata in superficie, viene trattata mediante opportuni sistemi di depurazione e, se possibile, riciclata. Uno schema di funzionamento di questa tecnologia è riportato in figura 2.



**Figura 2.** Schema di funzionamento del soil flushing.

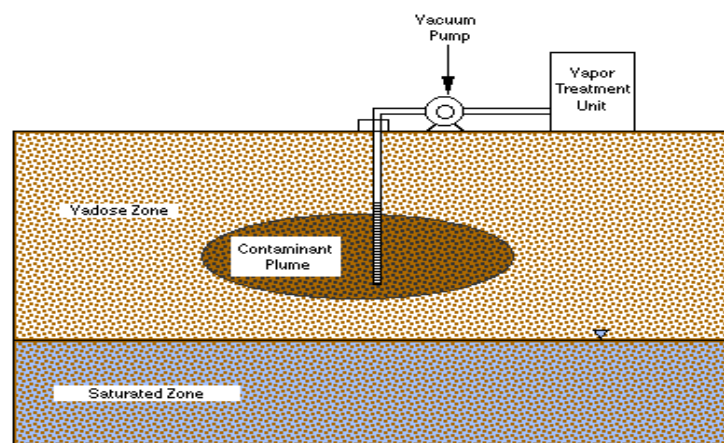
Generalmente la scelta della soluzione estraente (acqua o soluzioni acquose di acidi, basi, tensioattivi, surfattanti o co-solventi) dipende dal contaminante che si vuole estrarre. La tecnica di soil flushing presenta i vantaggi di non richiedere l'escavazione del suolo, di presentare costi contenuti e di permettere la continuazione delle attività produttive presenti sull'area interessata dall'inquinamento. Gli svantaggi, invece, sono

riconducibili alla necessità di monitorare l'eventuale migrazione laterale della contaminazione con la soluzione di lavaggio.

- **Soil washing (*ex-situ*):** i meccanismi chimico-fisici coinvolti nel soil washing sono analoghi a quelli del soil flushing. L'unica differenza consiste nel fatto che in questo caso il suolo è scavato per essere trattato in opportuni impianti. In un impianto di soil washing il lavaggio del terreno contaminato avviene in condizioni di turbolenza spinta (idrociclonatura). Sono previste anche delle fasi di separazione solido/liquido e di depurazione e riciclo dell'estraente.

I vantaggi di questa tecnica rispetto al soil flushing consistono nel fatto che avvenendo *ex-situ* il processo può essere più facilmente controllato, presenta maggiori efficienze di rimozione e tempi di trattamento più brevi. Gli svantaggi consistono nella necessità di scavo del terreno causando un aumento dei costi rispetto alla corrispondente tecnica *in-situ*. Infine, è necessario smaltire in discarica alcune frazioni solide separate durante il processo.

- **Soil venting (*in-situ*):** questa tecnica viene utilizzata per la rimozione di composti organici volatili (VOC) dal suolo. Applicando una depressione in corrispondenza della zona contaminata del terreno si abbassa la temperatura di ebollizione dei composti volatili che, in fase vapore, possono essere trasportati in superficie grazie ad un flusso aspirante e captati. I vapori contaminati vengono poi trattati in opportuni impianti disposti *on-site*. Una schematizzazione della tecnica di soil venting è riportata in figura 3.



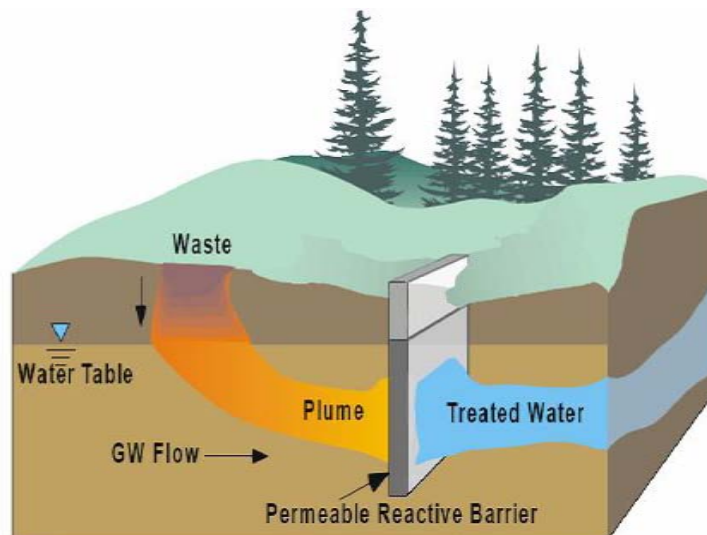
**Figura 3.** Schematizzazione della tecnica di soil venting.

I vantaggi connessi all'applicazione di questa tecnica sono riconducibili all'assenza di scavo del terreno e alla possibilità di continuare le attività produttive del sito. La tecnica inoltre si può applicare con costi contenuti e l'impatto sulle caratteristiche originali del terreno è minimo. Gli svantaggi consistono in tempi di bonifica lunghi e nella necessità di adottare misure di sicurezza molto accurate poiché i vapori trattati sono caratterizzati da un punto di infiammabilità molto basso.

- **Immobilizzazione con leganti (*in-situ/ ex-situ*):** questa tecnica viene realizzata mediante miscelazione del terreno contaminato con opportuni additivi che fissano il contaminante alla matrice inerte. Gli additivi più comunemente utilizzati sono costituiti da leganti idraulici (cemento), ma possono essere utilizzati anche dei leganti alternativi quali reagenti a base organica. Questa tecnica viene utilizzata principalmente per il trattamento di terreni contaminati da composti inorganici. I meccanismi di fissazione chimica sono riconducibili fondamentalmente alla diminuzione della solubilità del contaminante (precipitazione) o al legame di quest'ultimo con la matrice solida (adsorbimento). La miscelazione degli additivi col terreno può avvenire direttamente *in-situ* mediante trivelle o altre macchine perforatrici in grado di spingere il trattamento fino a 30-40 m di profondità.

A fronte dei vantaggi derivanti dalla diminuzione della mobilità dei contaminanti si hanno grossi svantaggi connessi agli elevati costi e alla totale alterazione delle caratteristiche originarie del suolo. La tecnica può essere condotta anche *ex-situ* estraendo il terreno e inviandolo agli impianti di trattamento. Il prodotto ottenuto viene poi stoccato in opportune zone di maturazione.

- **Barriere reattive permeabili (*in-situ*):** questa tecnica si basa sull'intercettazione del flusso idrico contaminato mediante barriere capaci di sottrarre allo stesso gli inquinanti e impedirne il trasporto nelle zone circostanti. Tale tecnica garantisce anche il risanamento dell'acquifero. Il principio del metodo è riportato in figura 4.



**Figura 4.** Schematizzazione dell'utilizzo delle barriere reattive permeabili.

Le configurazioni impiantistiche utilizzabili sono fondamentalmente due: la configurazione a trincea continua e la configurazione “funnel and gate”. Nella prima il flusso viene intercettato per intero dalla barriera. La configurazione “funnel and gate” prevede, invece, l'utilizzo di setti plastici a bassa permeabilità a forma di imbuto (funnel) per indirizzare il flusso di acqua dalla regione contaminata ad una zona di trattamento permeabile (“gate”). Il “gate” viene riempito con il materiale reagente.

I principali vantaggi di queste tecniche sono costituiti dalla semplicità impiantistica e dall'assenza di consumi energetici dovuti alle fasi di pompaggio sempre presenti nelle altre tecnologie di trattamento degli acquiferi. Il metodo è quindi molto economico in virtù della minimizzazione dei costi di gestione. Gli svantaggi sono costituiti dal fatto che è necessario periodicamente rigenerare il materiale di cui sono costituite le barriere poiché la saturazione, il consumo o l'occlusione dei pori portano col tempo alla diminuzione dell'efficacia delle stesse.

- **Air sparging (*in-situ*):** analogamente al soil venting questa tecnica si basa sulla volatilità dei contaminanti che si intende rimuovere dall'acqua di falda. L'aria viene immessa mediante dei tubi di iniezione nel suolo saturo al di sotto della zona contaminata e in virtù della volatilità dei contaminanti da estrarre si verifica un trasferimento degli stessi dalla fase liquida verso la fase gassosa immessa. Il gas contaminato, migrando verso l'alto, viene captato in corrispondenza della zona insatura del terreno e trattato mediante opportune unità impiantistiche. Tra i vantaggi del metodo

bisogna considerare la facilità di installazione e i brevi tempi necessari per il trattamento (1-3 mesi). Inoltre, utilizzando solo aria atmosferica non si ha nessuna alterazione delle caratteristiche originali del suolo ed è possibile continuare le attività produttive presenti nel sito anche durante la bonifica. Lo svantaggio del metodo, invece, consiste nel fatto che, per prevenire eventuali migrazioni incontrollate dei vapori contaminati, risultano necessarie numerose prove pilota che possono rallentare l'inizio dell'attività di bonifica.

### **1.1.5.2. Trattamenti termici**

I trattamenti termici richiedono l'uso di elevate temperature al fine di distruggere la causa della contaminazione o di favorirne il passaggio di fase. Questi trattamenti, nonostante garantiscano rendimenti di rimozione molto alti, sono generalmente costosi e in alcuni casi possono portare alla completa sterilizzazione del suolo che, al termine della bonifica, risulta inutilizzabile se non come materiale inerte.

- **Vetrificazione:** la vetrificazione consiste nel riscaldamento del terreno (1600 – 2000°C) seguito poi da un rapido raffreddamento. Questo processo porta alla formazione di un monolite amorfo in grado di intrappolare i contaminanti e sottrarli alla percolazione. La vetrificazione viene condotta grazie all'introduzione nel terreno di elettrodi in grafite sui quali vengono applicate delle differenze di potenziale dell'ordine di circa 4000 V. Questa tecnica consente rendimenti di rimozione superiori al 99% per quanto riguarda i contaminanti organici e garantisce un'ottima immobilizzazione dei contaminanti inorganici. D'altra parte la vetrificazione risulta estremamente costosa a causa dei notevoli consumi energetici e porta alla totale sterilizzazione e alterazione del suolo originario per cui può essere utilizzata solo in casi estremi di grave contaminazione (es. composti radioattivi) di piccoli volumi di terreno.

- **Desorbimento termico:** questa tecnica comporta la separazione fisica di contaminanti organici dalla matrice, mediante un riscaldamento diretto o indiretto a temperature che variano da 150 a 500°C. Il sistema favorisce la volatilizzazione dei contaminanti, ma non comporta la distruzione delle molecole. Tutti gli impianti di desorbimento termico richiedono sistemi di trattamento dei gas estratti per la rimozione dei contaminanti presenti. I sistemi a bassa temperatura sono stati utilizzati con successo

per il trattamento di terreni contaminati da idrocarburi leggeri e VOC non alogenati; i sistemi ad alta temperatura sono in grado di trattare composti organici semivolatili (SVOCs), IPA e, in alcuni casi, anche metalli volatili.

- **Incenerimento:** i terreni/rifiuti scavati, contaminati da composti organici, sono bruciati ad alte temperature, in genere comprese tra 900 e 1200°C, in presenza di ossigeno. L'efficacia del processo di combustione è generalmente molto elevata (dell'ordine del 99,9%) soprattutto nel trattamento di contaminanti organici difficilmente eliminabili quali diossine o PCB.

- **Pirolisi:** questa tecnica comporta la degradazione termica dei contaminanti in assenza di ossigeno. La pirolisi è un processo termico che trasforma le sostanze organiche inquinanti in composti gassosi, piccole quantità di liquidi e residui carboniosi. Generalmente si opera a temperature inferiori rispetto ai processi di incenerimento descritti in precedenza (450°C). I prodotti gassosi sono costituiti da CO, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e altri idrocarburi di basso peso molecolare la cui formazione può richiedere un ulteriore trattamento prima della emissione in atmosfera. Questa tecnologia si applica principalmente per il trattamento di composti semivolatili e pesticidi.

### 1.1.5.3. Trattamenti biologici o biorisanamento

I metodi biologici si basano sull'attività metabolica dei microrganismi, ovvero sull'insieme di reazioni chimiche operate dalle cellule per ottenere energia e produrre nuovo materiale indispensabile per la loro vita e riproduzione. In funzione del tipo di inquinante, i metodi biologici impiegano una varietà di microrganismi differenti (batteri e/o funghi) o piante. Tra i microrganismi maggiormente utilizzati per bonificare le aree inquinate si ricordano le specie appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Mycococcus*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, etc.

Rispetto alle tecnologie chimico-fisiche, il biorisanamento ha il vantaggio di essere eco-compatibile. Tra i possibili svantaggi, invece, bisogna considerare una degradazione incompleta dei contaminanti, la formazione di prodotti intermedi o finali più pericolosi di quelli originali e tempi di trattamento lunghi.

Per un'ottima bonifica è fondamentale considerare la concentrazione di inquinante, la densità di popolazione dei microrganismi degradatori e la potenzialità della bonifica (Bento *et al.*, 2005).

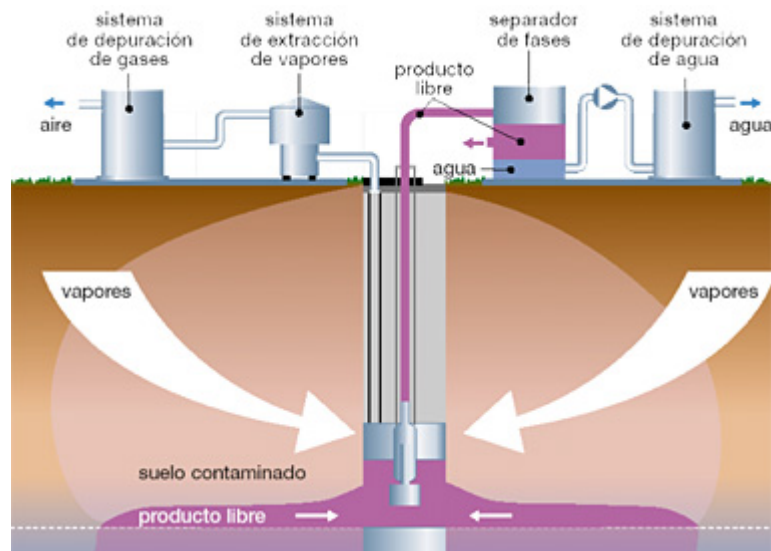
I principali trattamenti biologici sono:

- **Bioaugmentation (*in-situ*)**: questo processo consiste nell'introduzione nel sito da bonificare di microrganismi, autoctoni (indigeni) o alloctoni (fortuiti oppure transitori). I microrganismi vengono isolati da terreno o acque di falda ed accresciuti in presenza del contaminante da degradare. In questo modo è possibile isolare solo le popolazioni microbiche di interesse. Alcuni test di laboratorio permettono di valutare la biocompatibilità e le capacità degradative dei microrganismi selezionati prima del loro inoculo nel sito contaminato. Inoltre, per scegliere la dose di microrganismi più adatta da utilizzare, occorre prendere in considerazione:

- volume di contaminante,
- tipo e volatilità delle sostanze inquinanti,
- pH del suolo, temperatura del terreno, etc.

- **Biostimulation (*in-situ*)**: il processo di biostimulation prevede l'aggiunta di nutrienti addizionali sotto forma di fertilizzanti organici e/o inorganici, che sono in grado di incrementare la popolazione microbica indigena, potenzialmente in grado di degradare gli idrocarburi del contaminante. Poiché il carbonio (C) è il maggior costituente delle benzine, l'attenuazione va focalizzata sull'aggiunta di fosforo (P) e azoto (N), sia in forma organica che inorganica, al fine di ottenere un ottimo rapporto C:N:P (Thomas *et al.*, 1992). Tra i fertilizzanti inorganici si possono utilizzare urea, compost, segatura, concime e altro (Cho *et al.*, 1997; Namkoong *et al.*, 2002).

- **Bioventing (*in-situ*)**: ha come obiettivo la stimolazione dell'attività metabolica dei microrganismi autoctoni aerobici in grado di degradare i contaminanti presenti nel suolo. Tale tecnologia prevede l'utilizzo di pozzi e dreni per l'immissione di aria ed eventualmente uno o più pozzi per l'estrazione della stessa. I pozzi di estrazione sono collegati a delle pompe da vuoto che garantiscono la circolazione dell'aria nel terreno insaturo. In figura 5 è riportata la schematizzazione di un sistema di bioventilazione con soli pozzi di immissione.



**Figura 5.** Schema del processo di bioventilazione con pozzo di immissione.

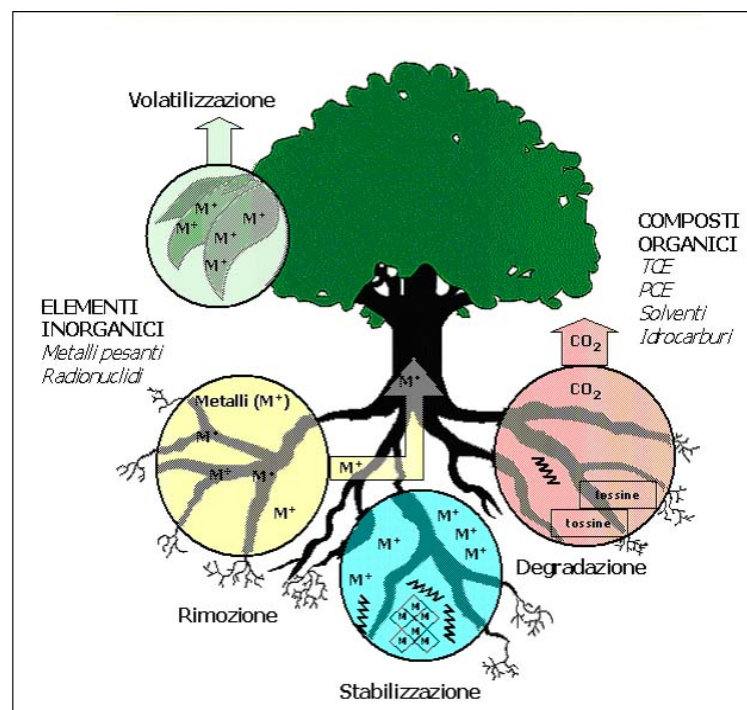
La volatilizzazione dei contaminanti deve essere evitata per non sottrarli all'azione degradativa promossa dai batteri presenti nel suolo. Un impianto di bioventilazione può comprendere un sistema d'irrigazione superficiale dell'area contaminata (qualora la superficie sia opportunamente permeabile) per la fornitura di acqua, necessaria al mantenimento dell'umidità ottimale e di nutrienti in forma solubile in modo tale da garantire un rapporto ottimale pari a circa  $C:N:P = 100:10:1$ . I contaminanti più comunemente trattati con questa metodica sono soprattutto toluene, benzene, fenoli, etilbenzene e xilene. I vantaggi del metodo sono costituiti dai limitati costi impiantistici e gestionali. Inoltre non si ha nessuna alterazione delle caratteristiche originali del suolo. Gli svantaggi sono costituiti dal fatto che spesso è necessario sottoporre la corrente gassosa in uscita ad opportuni trattamenti al fine di rimuovere i composti volatili in essa presenti.

- **Utilizzo di ceppi fungini (*in-situ*):** alcune specie di funghi sono in grado di operare la degradazione di inquinanti in quanto producono degli enzimi esocellulari (laccasi, Mn-perossidasi, lignina-perossidasi, etc.) capaci di ossidare, anche attraverso mediatori, una vasta gamma di composti aromatici. I principali meccanismi degradativi sono riconducibili a quelli di detossificazione attraverso metilazione di composti ossidrilati, quali clorofenoli e cloroaniline, e a quello di dealogenazione ossidativa. Per l'utilizzo di questa tecnica è necessario l'uso di ammendanti quali lignina e fonti di carbonio. I fattori che possono influenzare il processo sono:



- competizione con la microflora batterica autoctona,
- pH del suolo,
- uso di ammendanti (cometabolismo),
- presenza di metalli pesanti (per es. la presenza di Cu, Cd, Hg e Pb può inibire l'attività dei funghi).

• **Phytoremediation (*in-situ*):** è un processo che utilizza specie vegetali per la decontaminazione dei suoli sfruttando la capacità naturale delle stesse di captare, accumulare e degradare alcune tipologie di contaminanti. Le piante possono essere utilizzate sia per mineralizzare e immobilizzare composti organici tossici nella zona radicale, sia per accumulare e concentrare metalli ed altri composti inorganici estratti dal suolo nella porzione aerea (Figura 6).



**Figura 6.** Schema dei meccanismi coinvolti nella phytoremediation.

I meccanismi coinvolti sono:

-miglioramento delle capacità biodegradative della rizosfera: la proliferazione della popolazione microbica in prossimità dell'apparato radicale è favorita dal rilascio di essudati da parte delle specie vegetali. La quantità di batteri presenti in prossimità

dell'apparato radicale è di un ordine di grandezza 1 o 2 volte superiore rispetto a quello di un suolo non vegetato;

-fitoestrazione: il processo sfrutta la capacità di alcune piante dette “metallo-accumulatrici” di estrarre i metalli dal terreno attraverso l'apparato radicale e di concentrarli nella parte aerea. L'assorbimento dei metalli da parte dei vegetali può essere favorito dall'aggiunta di composti chimici che aumentino la mobilità dei metalli nel suolo;

-fitodegradazione: questo meccanismo consiste nella metabolizzazione dei contaminanti all'interno della pianta. Le piante, infatti, producono degli enzimi, quali dealogeansi e ossigenasi, in grado di catalizzare la degradazione di composti organici aromatici e di alcuni composti alifatici alogenati;

-fitostabilizzazione: è una tecnica che fa uso di specie metallo-tolleranti che producono dei composti chimici in grado di immobilizzare i metalli all'interfaccia radici-suolo. Questa tecnica permette quindi di ridurre la mobilità dei metalli e impedisce la migrazione dei contaminanti nelle acque sotterranee senza che gli stessi contaminanti vengano rimossi dal terreno.

I vantaggi del metodo consistono nella elevata semplicità ed economicità mentre gli svantaggi sono costituiti dai notevoli tempi necessari per la bonifica (anche decine di anni). Inoltre, poiché la bonifica può essere effettuata solo all'interno del volume interessato dalle radici delle piante, la profondità dell'area da bonificare è limitata.

- **Landfarming (*ex-situ*)**: consiste nella incentivazione dei processi metabolici aerobici attuati dalla microflora batterica (che può essere quella autoctona oppure inoculata durante il processo), garantendo una opportuna esposizione del terreno all'ossigeno atmosferico e ottimizzando le condizioni operative in termini di apporto di nutrienti, temperatura e umidità. L'esposizione all'ossigeno atmosferico viene garantita stendendo un sottile strato di terreno contaminato (dello spessore di circa 40-50 cm) al di sopra di un letto drenante di sabbia o ghiaia in modo tale da permettere la penetrazione naturale dell'aria. Il letto di sabbia è disposto a sua volta su un manto impermeabile in PVC avente lo scopo di evitare la percolazione dei contaminanti nel sottosuolo. L'opportuno grado di umidità può essere garantito mediante sistemi di irrigazione a spruzzo o mediante ricircolo del percolato stesso. Prima di iniziare il trattamento bisogna dissodare ed omogeneizzare il terreno inquinato, rimuovere le rocce grossolane, dosare i nutrienti, controllare ed, eventualmente, modificare il pH.

Il landfarming è stato applicato con successo a terreni omogenei contaminati da sostanze facilmente o moderatamente degradabili (idrocarburi alifatici, aromatici, fenoli, oli minerali). Il principale vantaggio del landfarming è la sua economicità mentre gli svantaggi sono riconducibili alla forte dipendenza dell'efficacia del metodo dalle condizioni ambientali e alla necessità di ampie superfici.

- **Compostaggio (*ex-situ*):** è una tecnica utilizzata nel trattamento dei rifiuti solidi e dei fanghi di depurazione dei reflui civili. Il principio del metodo è analogo a quello visto con il landfarming. I cumuli di terreno hanno altezze generalmente variabili tra 0.9 e 1.8 m e sono periodicamente rivoltati per mantenere le condizioni aerobiche. Il terreno deve essere preventivamente trattato con agenti rigonfianti per incrementare la porosità e consentire l'uniforme distribuzione degli additivi ed il trasferimento dell'ossigeno. La fornitura dell'ossigeno può avvenire mediante il rivoltamento periodico oppure l'insufflazione e/o l'aspirazione dell'aria. Per accelerare il processo, si può prevedere l'insufflazione di aria calda.

- **Bioreattori (*ex-situ*):** il trattamento in bioreattori a fase semisolida (detto anche "bioslurry") prevede una prima vagliatura del terreno per la rimozione del materiale di dimensioni grossolane (>2mm), seguita da un'ulteriore selezione finalizzata alla separazione della frazione fine sulla quale è adsorbita la maggiore parte degli inquinanti. Successivamente vengono aggiunti: acqua per il 40-90% in peso, nutrienti, ed eventualmente tensioattivi utili al desorbimento dei contaminanti poco solubili in acqua. La miscela così ottenuta viene inviata al reattore dove viene fornito ossigeno. Il processo viene controllato ed ottimizzato attraverso il controllo del pH e della temperatura. Una volta completata la biodegradazione, la miscela viene rimossa e disidratata mediante diversi sistemi di separazione solido-liquido, e l'acqua viene recuperata e riciclata.

I contaminanti trattabili con questa metodologia comprendono solventi, idrocarburi policiclici aromatici, pesticidi, idrocarburi del petrolio, pentaclorofenolo (PCP) e clorofenoli in genere. I vantaggi di questa tecnica sono un rendimento di rimozione in genere superiore al 90% e tempi di trattamento brevi (3-30 giorni). Il principale svantaggio del metodo consiste, invece, nella necessità di trattare la frazione liquida residua con ulteriore aumento dei costi.

- **Processo a ricircolazione d'acqua in terreno saturo (*in-situ*):** tale processo consiste nell'estrarre l'acqua contaminata a valle del sito tramite pozzi d'estrazione, eventualmente trattarla in superficie, arricchirla in accettori di elettroni e in nutrienti e re-immetterla a monte della zona contaminata mediante pozzi d'iniezione. L'acqua, arricchita in ossigeno e nutrienti, consente l'instaurarsi delle condizioni ottimali per l'attività metabolica dei microrganismi, promuovendo in tal modo la biodegradazione del contaminante. Generalmente, a causa della sua bassa solubilità in acqua, l'ossigeno risulta essere il fattore limitante la velocità di biodegradazione dei contaminanti.

I vantaggi del metodo consistono nell'elevata semplicità impiantistica e nella sua relativa economicità. Il processo, inoltre, non produce alcun residuo da smaltire o trattare ulteriormente. Per contro, esistono gli svantaggi derivanti dai lunghi tempi necessari per il trattamento e dalla necessità di monitorare accuratamente il sistema sia per evitare la fuga di acque di falda contaminate sia per evitare l'intasamento dei pozzi di iniezione mediante pellicole batteriche.

- **Bioinsufflazione + bioventilazione (*in-situ*):** questo trattamento prevede l'utilizzo di pozzi d'iniezione a piccolo diametro che permettono l'immissione d'aria compressa (bioinsufflazione) nella porzione contaminata dell'acquifero. L'iniezione d'aria agisce con meccanismi differenti su due categorie di contaminanti rinvenibili in falda:

-inquinanti altamente volatili. Adsorbiti alle particelle di terreno, ovvero disciolti in fase liquida, al passaggio dell'aria si trasferiscono (rispettivamente per volatilizzazione e strippaggio) in fase vapore e migrano verso l'alto dove possono essere biodegradati direttamente nel terreno insaturo o immediatamente raccolti e captati tramite un sistema d'estrazione sottovuoto, e quindi trattati prima di essere scaricati in atmosfera assieme all'aria di estrazione;

-inquinanti poco volatili. L'aria immessa fornisce l'ossigeno necessario per l'attività biodegradativa, condotta direttamente nell'acquifero ed in fase liquida, di tali contaminanti.

- **Biobarriera o filtri microbiologici (*in-situ*):** si tratta di vere e proprie barriere di filtri microbiologici il cui utilizzo deriva dalla necessità di superare la difficoltà di distribuire in maniera uniforme all'interno dell'acquifero i vari composti (ossigeno e nutrienti) necessari all'attività metabolica della microflora batterica utilizzata. Sono possibili diverse soluzioni tecniche:

-filtri microbiologici a trincea, con ceppo batterico selezionato: è preliminarmente previsto lo scavo di una trincea ed il suo riempimento con materiale granulare sabbioso. Si procede quindi all'inoculazione di un ceppo batterico selezionato per la biodegradazione del contaminante che fluisce con l'acqua attraverso la barriera. I batteri, adesi alle particelle sabbiose, si trovano concentrati in uno spazio confinato e controllabile;

-trincea drenante, con aerazione dal fondo mediante tubazione orizzontale perforata: è consigliabile adoperare nel riempimento della trincea un materiale granulare ad elevata capacità di adsorbimento (carboni attivi, sabbia mista a compost);

-barriera a lento rilascio di ossigeno: si tratta di una batteria di pozzi contenenti maniche filtranti riempite con prodotto a rilascio lento e controllato di ossigeno.

I vantaggi del metodo consistono nei minori costi energetici derivanti dall'assenza di operazioni di pompaggio e dalla possibilità di trattare acquiferi molto eterogenei. Lo svantaggio principale di questo metodo è legato alla necessità di dover rigenerare periodicamente il filtro con nuova biomassa a causa di fenomeni di trascinamento del film biologico con l'acqua filtrante a valle della barriera e a causa di fenomeni di otturazione del filtro con pellicole batteriche.

## **1.2. Microrganismi e lotta biologica**

### **1.2.1. La lotta biologica in patologia vegetale**

Si definisce lotta biologica o biocontrollo *“l'utilizzo di organismi naturali o modificati, di geni o prodotti genici, atti a ridurre gli effetti degli organismi indesiderati, e per favorire quelli utili all'uomo, alle coltivazioni, agli animali e ai microrganismi simbiotici”*, includendo in questa definizione anche le *“pratiche di lotta agronomica e l'applicazione delle recenti tecniche di biologia molecolare per lo sviluppo di nuove biotecnologie”* (Accademia Nazionale della Scienza degli Stati Uniti -NAS, 1987).

Attualmente si ritiene che il controllo biologico in Patologia Vegetale possa esplicarsi attraverso tre strategie:

- contenimento della popolazione del patogeno mediante interventi sul suolo o sull'ambiente;
- sfruttamento della resistenza della pianta ospite;

- applicazione di microrganismi antagonisti per escludere l'infezione (Gabriel e Cook, 1991).

#### **1.2.1.1. Contenimento della popolazione del patogeno**

Nei suoli cosiddetti soppressivi la virulenza del patogeno è attenuata o addirittura annullata, e la gravità delle malattie nelle piante suscettibili risulta del tutto assente o appena manifesta anche quando il patogeno è presente in quantità notevoli e le condizioni ambientali sono favorevoli allo sviluppo della malattia (Cook e Baker, 1983).

Suoli soppressivi sono stati trovati per importanti agenti patogeni quali ad esempio *F. oxysporum*, *Pythium debaryum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* f. sp. *tritici* (Agrios, 1998).

La repressività di un suolo dipende sia da componenti abiotiche, quali la struttura e la composizione chimico-fisica del suolo, sia biotiche, come la competizione tra i diversi microrganismi che popolano il terreno e, soprattutto, dalla presenza di microrganismi antagonisti noti per la loro azione di biocontrollo. Tra questi ricordiamo funghi appartenenti ai generi *Trichoderma*, *Penicillium*, *Sporidesmium* e batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces*.

La repressività di un suolo può anche essere trasferita mescolando terreno repressivo con uno non repressivo, ad esempio ciò ha portato ad una riduzione di fitopatie causate da *F. oxysporum*, *P. cinnamomi* e *R. solani* ed altri patogeni fungini (Cook e Baker, 1983).

Un altrettanto efficace metodo di controllo delle malattie può essere raggiunto con le comuni pratiche agronomiche, quali la solarizzazione, la rotazione colturale e l'ammendamento (Agrios, 1998).

#### **1.2.1.2. Resistenza della pianta ospite**

Le colture vegetali sono minacciate da un gran numero di potenziali microrganismi patogeni come batteri, funghi, virus e nematodi. Le piante, per riconoscere e prevenire l'invasione di tali patogeni ed evitare l'insorgenza delle malattie, hanno sviluppato

complessi meccanismi di difesa che le rendono in grado di tollerare o bloccare l'agente eziologico.

La tolleranza è intesa come la capacità della pianta di sopportare l'azione o l'invasione di un patogeno senza o quasi reazione, come dimostrato dall'assenza completa o quasi di sintomi e danno (APS, 1988). La resistenza si identifica, invece, con la capacità da parte della pianta di annullare o ridurre l'attività di un patogeno (APS, 1988). I meccanismi di resistenza delle piante possono essere di tipo meccanico o biochimico, questi ultimi a loro volta sono suddivisi in base alla loro origine in pre-infezionali o post-infezionali.

Le difese meccaniche preesistenti all'infezione sono rappresentate da strutture atte ad impedire l'adesione e la penetrazione del patogeno, e la sua successiva colonizzazione dei tessuti dell'ospite (ad es. presenza e spessore della cuticola, presenza di cera, di peli, di stomi e lenticelle aventi forma, grandezza o posizione particolari, la struttura stessa della parete cellulare).

Altre modificazioni di tipo morfologico e strutturale possono svilupparsi nella pianta successivamente all'infezione, impedendo o rallentando la penetrazione del patogeno. Tra queste ricordiamo la formazione di tille o di gomme contenenti tannini, la creazione di uno strato ligno-suberizzato nella parete cellulare e di strati di abscissione, la deposizione di gomma e la morte delle cellule invase dal patogeno o di quelle circostanti il punto di infezione, risposta nota come reazione di ipersensibilità (HR).

Le difese di natura biochimica pre-infezionali sono legate, invece, al rilascio di essudati fungitossici e di sostanze ad attività antifungina, sintetizzate precedentemente al tentativo di infezione, quali composti fenolici (acido caffeico, catecolo), glucosidi (saponine, glucosidi fenolici) e glucosinolati.

Le difese biochimiche post-infezionali consistono nella secrezione di sostanze prodotte *ex-novo*, oppure presenti prima dell'infezione ma in quantità ridotte e successivamente aumentate, come ad esempio i fenoli (attivi nella forma ossidata dalle fenolasi, fenolossidasi, perossidasi e polifenolossidasi), le fitoalessine, i sesquiterpeni, i ROS (specie reattive dell'ossigeno), le proteine PR (pathogenesis related proteins = proteine correlate alla patogenesi), etc. I ROS, che hanno un ruolo diretto come molecole antimicrobiche e come molecole segnale per attivare la reazione di ipersensibilità e la ISR (resistenza sistemica indotta), possono distruggere le membrane cellulari producendo perossidi lipidici e, nello stesso tempo, favorire reazioni che rafforzano le pareti cellulari. Le proteine PR sono proteine vegetali indotte da stress biotici e abiotici:

comprendono enzimi (glucanasi, proteasi, perossidasi), inibitori di proteasi, proteine ricche in glicina o cisteina, osmotine e tarmatine. Nell'ambito di queste proteine risultano essere particolarmente interessanti chitinasi e glucanasi, enzimi che catalizzano rispettivamente l'idrolisi della chitina e dei  $\beta$ -glucani, ovvero i principali costituenti delle pareti cellulari della maggior parte dei funghi. Si ritiene che questi enzimi siano responsabili della lisi dell'apice ifale, con conseguente inibizione della crescita fungina e del rilascio di sostanze che elicitano le risposte di difesa della pianta (Sahai e Manocha, 1993).

Una caratteristica comune della resistenza delle piante alle malattie è la risposta ipersensibile nella zona di infezione, caratterizzata da una morte rapida e localizzata di cellule al sito di attacco, al fine di evitare l'accesso ai nutrienti e limitare la proliferazione del patogeno. Tale reazione non è un semplice fenomeno di resistenza di tipo meccanico in quanto l'infezione viene bloccata anche nelle cellule lontane dal punto di infezione. Infatti, a seguito di questa risposta localizzata, il tessuto distale la zona di infezione sviluppa una resistenza sistemica acquisita (SAR) nei confronti di successive infezioni da parte dello stesso o di altri patogeni.

#### **1.2.1.3. Microrganismi benefici ed agenti di biocontrollo**

Il suolo è sottoposto a continue modifiche dovute al movimento delle radici che alterano la distribuzione delle sostanze nutritive e dell'acqua (Whipps, 2001). Queste modifiche vanno ad influenzare anche l'attività di differenti microrganismi rizosferici. Il mucigel, costituito da polisaccaridi e mucopolisaccaridi e secreto dalle radici, funge da adesivo per saprofiti, simbiotici, patogeni, antagonisti, e/o nematodi che invadono i tessuti radicali o colonizzano la superficie (Burge, 1988).

Gli essudati radicali vanno ad influenzare anche i microrganismi che non sono a stretto contatto con la radice, quindi possono stimolare o inibire la presenza di specifici microrganismi con conseguente alterazione delle relazioni tra varie specie microbiche (Agrios, 1998). La microflora presente nella rizosfera contiene numerose specie di alghe, batteri, attinomiceti, funghi, lieviti, etc. Oltre ad essere coinvolti nei processi di decomposizione della materia organica, nella rimozione di sostanze tossiche e nella partecipazione al ciclo dei nutrienti, tali microrganismi sono in grado di sopprimere le



malattie delle piante causate da patogeni terricoli e di stimolare la crescita delle piante (Kubicek e Harman, 1998).

I microrganismi benefici rizosfera-competenti più comuni e studiati sono bacilli, attinomiceti, pseudomonadi, agrobatteri, funghi micorrizici e funghi dei generi *Trichoderma*, *Gliocladium* e *Fusarium*.

**Bacilli:** i batteri appartenenti al genere *Bacillus* sono Gram-positivi, a forma di bastoncino, aerobi o anaerobi facoltativi. Sono ubiquitari, ma il suolo è considerato il loro habitat principale. I bacilli sono in grado di vivere e adattarsi anche in ambienti caratterizzati da condizioni di pH, temperatura e salinità alle quali è difficile rinvenire altri microrganismi; possono comportarsi da saprofiti e vivere degradando materia organica non vivente. Spesso sono antagonisti nei confronti di altri microrganismi (tabella 1) attraverso la produzione di metaboliti antibiotici, ma possono essere patogeni anche per animali ed insetti (Whipps, 2001).

*B. subtilis*, *B. mycoides* e *B. cereus*, specie antagoniste dominanti nella rizosfera, producono numerosi antibiotici tra cui la polimixina, la difficidina, la subtilisina, etc., che sono attivi sia contro batteri che funghi. Varie specie di bacilli hanno attività antagonistica tra loro mediante la produzione di batteriocine: in altri termini, in condizioni di scarso nutrimento, alcuni bacilli producono antibiotici per uccidere i loro simili allo scopo di alimentarsene per sopravvivere.

**Tabella 1.** Batteri antagonisti utilizzati come agenti di lotta biologica.

BATTERIO ANTAGONISTA	PATOGENO BERSAGLIO	PIANTA PROTETTA
<i>Bacillus</i> spp.	<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i> , <i>R. solani</i>	Grano
<i>B. subtilis</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	Cece
<i>P. aureofaciens</i>	<i>P. ultimum</i>	Pomodoro
<i>Agrobacterium</i> , <i>radiobacter</i> K84	<i>A. tumefaciens</i>	Fruttifere, ornamentali
<i>S. plymuthica</i>	<i>P. ultimum</i>	Cetriolo

**Attinomiceti:** sono batteri Gram-positivi capaci di formare spore, che hanno morfologia molto simile a quella dei funghi filamentosi. Gli attinomiceti sono ubiquitari ma si trovano principalmente nel suolo. Essi mostrano diversi tipi di metabolismo sia aerobico, sia anaerobico, e utilizzano il carbonio sotto svariate forme; inoltre, sono capaci di degradare composti organici utilizzandoli per la loro crescita.

Gli attinomiceti sono noti per la loro capacità di produrre metaboliti secondari biologicamente attivi dotati di attività antibatterica e antifungina. Tra questi vi sono sostanze antibatteriche come l'attinomicina, la streptomicina, la tetraciclina, la kanamicina e sostanze antifungine come la candicidina e la nistatina (Hornby, 1990).

Oltre agli antibiotici, gli attinomiceti producono sostanze che possono inibire o promuovere la crescita di altri microrganismi, come vitamine, siderofori ed ormoni. Quando colonizzano la rizosfera possono comportarsi sia da antagonisti nei confronti di altri microrganismi presenti, sia da promotori della crescita delle piante. Gli essudati radicali inducono la crescita di attinomiceti antagonisti di patogeni fungini. A loro volta questi attinomiceti producono sostanze antimicrobiche che probabilmente agiscono contro i competitori biologici presenti nel suolo e proteggono la pianta da potenziali patogeni.

**Pseudomonadi:** sono stati identificati numerosi ceppi di *Pseudomonas* spp. capaci di svolgere sia un'azione antagonista diretta nei confronti di fitopatogeni, sia di indurre nella pianta una risposta di resistenza alle malattie. La presenza di pseudomonadi è stata frequentemente associata alla soppressività dei suoli, che dipende in gran parte dalla loro capacità di produrre composti antibiotici (Bloem *et al.*, 2005). Per esempio, da terreni soppressivi di fitopatie come il marciume nero del tabacco e il mal del piede del grano sono stati isolati ceppi di *Pseudomonas* produttori di 2,4-diacetilfloroglucinolo, un metabolita dotato di una notevole attività antifungina.

*P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* e *P. syringae* sono stati identificati come agenti di biocontrollo nei confronti sia di batteri che di funghi fitopatogeni.

**Agrobatteri:** tra gli agrobatteri vi sono sia forme patogene, come *A. tumefaciens*, che forme non patogene, come *A. radiobacter*. *A. tumefaciens* è l'agente causale della galla del colletto o tumore batterico, una malattia diffusa in tutto il mondo che provoca seri problemi, specialmente nei vivai di piante da frutto ed ornamentali, rendendo non commerciabili le piantine infette. Tutti i metodi chimici e fisici applicati per la lotta a

questa malattia si sono dimostrati poco soddisfacenti. I migliori risultati sono stati ottenuti con la lotta biologica, utilizzando il ceppo non patogeno K84 di *A. radiobacter*, produttore di agrocina 84, antibiotico molto specifico per i ceppi patogeni di *A. tumefaciens*.

**Funghi:** molti funghi vivono esclusivamente nel suolo dove hanno un ruolo estremamente importante nella biologia della rizosfera andando a colonizzare frammenti di tessuti vegetali, interagire con le radici delle piante, con altri funghi, batteri o elementi del suolo (Kubicek e Harman, 1998). I funghi sono in grado di crescere e diffondersi nel suolo mediante la formazione di ife alterando le relazioni microbiche in esso presenti.

Le relazioni che questi microrganismi sviluppano con le piante e con la comunità microbica possono essere neutre, antagonistiche o benefiche. Va comunque sottolineato che la maggioranza delle fitopatie è causata da funghi e che ciascuna pianta può essere attaccata da più di un fungo e ciascun fungo può attaccare più di una pianta. I funghi possono essere parassiti obbligati, se hanno bisogno di un'associazione con la pianta per tutta la durata del loro ciclo vitale, oppure parassiti non obbligati, se necessitano della pianta solo per una parte del loro ciclo vitale, mentre durante il resto della loro vita sono saprofiti. I funghi fitopatogeni sono in grado di attaccare tutte le parti della pianta, causando gravi perdite di produzione sia alle colture in pieno campo e sotto serra che in post-raccolta, ad esempio durante la conservazione (Agrios, 1998).

Sono note numerose interazioni tra funghi antagonisti e funghi patogeni che determinano effetti benefici per le colture. Ad esempio è ben noto che varie specie di *Trichoderma* possono essere usate quali agenti di biocontrollo verso numerosi agenti fitopatogeni (Chet, 1987; Harman e Bjorkman, 1998; Harman e Kubicek, 1998; Papavizas, 1985; Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004a).

I funghi possono interagire anche con organismi animali come i nematodi presenti nella rizosfera. I funghi predatori, per nutrirsi, sviluppano strutture specializzate che aderiscono al corpo del nematode. Molti funghi sono anche parassiti di insetti ed altri artropodi.

#### 1.2.1.4. Meccanismi di azione degli agenti di biocontrollo

L'inoculo di agenti di biocontrollo sulla pianta o direttamente nel suolo, all'inizio del ciclo di crescita della pianta, è tra le strategie di lotta biologica più interessanti (Cook e Baker, 1983). Sono stati individuati molti microrganismi antagonisti, sia tra i funghi che tra i batteri, capaci di ridurre l'incidenza di varie fitopatie e di favorire lo sviluppo della pianta.

L'azione di biocontrollo nei confronti dei patogeni si può esplicitare attraverso diversi meccanismi d'azione, nell'ambito dei quali i principali sono risultati essere l'antibiosi, la competizione ed il parassitismo.

L'**antibiosi** si esplica attraverso la produzione da parte di funghi e batteri antagonisti di metaboliti capaci di inibire l'accrescimento e lo sviluppo di microrganismi patogeni, ma che svolgono attività letale solo quando penetrano e si accumulano nelle cellule. Tra i più studiati agenti produttori di antibiotici troviamo *P. fluorescens*, batterio in grado di produrre le fenazine, che sono stati i primi antibiotici ad essere risultati chiaramente implicati nel biocontrollo. Questi microrganismi utilizzano dei sensori ambientali per determinare la densità della popolazione nella rizosfera e regolare la produzione di antibiotici (Weller e Cook, 1983; Brisbane e Rovira, 1988). Tra le sostanze antibiotiche prodotte dai funghi sono da ricordare la gliovirina e la gliotossina, prodotte da diversi ceppi di *T. virens* (Bisset, 1991), che svolgono un importante ruolo nel controllo di funghi del genere *Pythium* (Wilhite *et al.*, 1994); la chaetomina, prodotta del genere *Chaetomium*, è invece responsabile del controllo di *Venturia inaequalis*, agente causale della ticchiolatura del melo (Davis *et al.*, 1992), etc.

La **competizione** può instaurarsi per lo spazio o per le sostanze nutritive necessarie al patogeno per l'attacco parassitario o per il suo sviluppo. Un esempio di tal genere è la competizione per il ferro in suoli dove il pH è inferiore a 7, operato da batteri specialmente del genere *Pseudomonas*. Infatti questi batteri, ma anche alcuni funghi, hanno sviluppato sistemi di assimilazione del ferro altamente efficaci, basati sull'uso di siderofori che legano selettivamente il ferro  $Fe^{3+}$  che viene poi trasportato all'interno della cellula da una proteina specifica. L'antagonista, sequestrando il ferro e rendendolo indisponibile per gli altri microrganismi, riesce così ad escludere il patogeno dalla nicchia ecologica abituale, esponendolo quindi a stress ambientali e nutrizionali e/o

interrompendone il ciclo riproduttivo (Duijff *et al.*, 1993). In particolare, per diverse specie vegetali è stata osservata una riduzione della colonizzazione delle radici da parte di *F. oxysporum* in presenza di ceppi non patogeni della stessa specie.

Il **parassitismo** è una forma di interazione di tipo nutrizionale e quindi parassitaria che si instaura tra l'antagonista ed il patogeno. L'antagonista stabilisce un'intima associazione con il patogeno, da cui preleva una parte o tutti i suoi nutrienti. Questo meccanismo prevede normalmente una fase di contatto fisico con l'ospite che assomiglia per molti aspetti alla tipica interazione pianta-patogeno. Tale interazione è detta micoparassitismo e prevede diverse fasi quali: riconoscimento a distanza, crescita chemiotattica verso l'ospite, instaurazione di un'interazione fisica compatibile tra i due organismi, formazione di strutture specializzate (tipo appressorio), penetrazione, colonizzazione dell'ospite ed evasione (Kubicek *et al.*, 2001; Harman *et al.*, 2004a).

Tra gli esempi di funghi parassiti vi è *Trichoderma* spp. in grado di attaccare *R. solani*, e molti altri funghi patogeni (Chet, 1987), lo *S. sclerotivorum*, che parassitizza gli sclerozi di *Sclerotinia minor* (Fravel *et al.*, 1992), o il *Verticillium biguttatum* che attacca *R. solani* (Van den Boogert *et al.*, 1990).

I tre meccanismi di biocontrollo descritti precedentemente non si escludono tra loro e possono integrarsi, come nel caso di molti isolati di *Trichoderma* spp. che esplicano contemporaneamente azione micoparassitica, antibiotica e competitiva (Benitez *et al.*, 2004; Scott, 1995). Oltre agli organismi benefici citati ricordiamo, tra i batteri antagonisti, quelli appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Serratia* e *Agrobacterium*, e tra i funghi *Chaetomium*, *Coniothirium*, *Gliocladium*, *Glomus*, *Pythium* e *Fusarium* (tabella 2).

**Tabella 2.** Esempi di microrganismi usati per il biocontrollo.

MICRORGANISMI	COMPOSTI O MECCANISMI	PATOGENI CONTROLLATI
<b><u>Batteri:</u></b>		
<i>P. fluorescens</i>	Diacetilfluoroglucinolo, cianuro di idrogeno	<i>Thielaviopsis basicola</i> , altri
<i>P. fluorescens</i>	Oomicina e pioluteorina, siderofori	<i>P. ultimum</i>
<i>P. fluorescens</i>	Siderofori, acido antranilico	<i>G.graminis</i> var. <i>tritici</i>
<i>A. radiobacter</i> K84	Agrocina 84	<i>A.tumefaciens</i>
<i>S. marcescens</i>	Enzimi chitinolitici	Vari
<b><u>Funghi:</u></b>		
<i>T. virens</i>	Gliovirina, gliotossina	<i>P. ultimum</i>
<i>T. harzianum</i>	Peptaiboli	<i>Botrytis cinerea</i> , altri
<i>T. harzianum</i>	Competizione per i nutrienti e lo spazio	Vari
<i>Trichoderma</i> spp.	Micoparassitismo	Vari
<i>V. biguttatum</i>	Micoparassitismo	<i>R. solani</i>
<i>C. globosum</i>	Micoparassitismo	<i>Alternaria</i> spp.

### 1.2.2. Prodotti commerciali utilizzati nella lotta biologica

L'uso di microrganismi antagonisti per controllare agenti fitopatogeni, nematodi ed erbe infestanti è cominciato oltre 50 anni fa, ed oggi sono disponibili diversi formulati a base di funghi e batteri antagonisti utilizzabili come biofitofarmaci. Questi prodotti possono essere costituiti da un singolo organismo o da una miscela di organismi e/o loro metaboliti, che esplicano la loro attività attraverso i meccanismi d'azione precedentemente esaminati.

Per raggiungere uno sviluppo commerciale, un ceppo antagonista deve soddisfare diversi criteri: assenza di tossicità e incapacità di produrre effetti collaterali indesiderati, adattamento all'ambiente e persistenza in campo almeno per una stagione produttiva, efficacia in diverse aree geografiche, stabilità genetica e biologica, preparazione facile ed economica, etc. (Lorito *et al.*, 2006). Individuato il ceppo con le migliori caratteristiche di biocontrollo si deve produrre una biomassa sufficientemente stabile, anche in condizioni avverse, e sviluppare sistemi di applicazione che assicurino la crescita e l'attività antagonistica nei confronti dei fitopatogeni.

I funghi antagonisti possono essere usati in diversi modi. In generale, la biomassa del fungo antagonista (cellule, micelio, spore) viene trattata ed incorporata in differenti matrici per la preparazione di formulati granulari, in polvere, liquidi, etc. Diversi studi hanno messo in evidenza che l'efficacia del prodotto può dipendere dal tipo di formulazione e dalle modalità di somministrazione (Lorito *et al.*, 2006).

Oggi sono disponibili sul mercato un centinaio di prodotti a base di batteri, funghi o lieviti antagonisti legalmente registrati ed utilizzabili anche in agricoltura biologica. Circa metà di questi prodotti, di cui alcuni esempi sono riportati in tabella 3, è a base di *Trichoderma* e *Gliocladium*.

Oltre ai prodotti registrati specificamente per la difesa delle colture, si trovano in commercio e si utilizzano una varietà di bioprotettori, biostimolanti e biofertilizzanti. La diffusione di questi prodotti è molto ampia grazie anche alla necessità di ridurre l'applicazione di prodotti fitosanitari di sintesi o di ottenere la certificazione di prodotto proveniente da agricoltura biologica. Per quanto riguarda la lotta biologica contro funghi e batteri fitopatogeni con prodotti a base di antagonisti batterici, ceppi di *P. syringae* possono essere impiegati contro *P. expansum*, *B. cinerea*, *Monilina fructicola*, *Rhizopus stolonifer*, etc.

*P. fluorescens* è efficace nel controllo di malattie causate soprattutto da funghi terricoli, mentre varie specie di *Bacillus* sono attive soprattutto sulla superficie fogliare e hanno la caratteristica di formare spore sufficientemente resistenti da essere facilmente utilizzabili in formulati commerciali.

Oltre ai microrganismi antagonisti, nella lotta biologica si possono utilizzare anche molecole da essi derivate, in grado di agire contro i patogeni sia inibendone direttamente la crescita ed eventualmente causandone la morte, sia indirettamente inducendo una risposta di difesa nella pianta. Gli enzimi degradativi prodotti dai microrganismi antagonisti rappresentano un'ottima prospettiva per lo sviluppo di nuovi prodotti e strategie di difesa contro i funghi fitopatogeni. Essi hanno la capacità di sinergizzare l'effetto di vari fungicidi di sintesi (Fogliano *et al.*, 2002). Per questi motivi, le miscele enzimatiche possono essere utilizzate sia tal quali come fungicidi biologici, sia come coadiuvanti di principi chimici di sintesi, permettendo di ridurre significativamente le concentrazioni di anticrittogamici chimici.

L'uso commerciale di metaboliti antibiotici prodotti dagli antagonisti, invece, è sostanzialmente limitato dai possibili effetti tossici che l'accumulo di questi composti nell'ambiente e nei prodotti agricoli può avere sulla salute dell'uomo (Lorito *et al.*, 2006).



**Tabella 3.** Alcuni prodotti commerciali contenenti microrganismi antagonisti.

ORGANISMO	APPLICAZIONE O FORMULAZIONE	USI RACCOMANDATI, LUOGO E COLTURE	ATTIVITÀ DICHIARATE DEL PRODOTTO	PRODOTTI COMMERCIALI
<i>Trichoderma</i> spp.	Granulare	Culture serricole, vivai, piante da interno	Lotta al deperimento di plantule, marciume radicale	Soilgard 12G (Certis, USA)
<i>T. harzianum</i> , <i>T. virens</i> (= <i>T. lignorum</i> , <i>G. virens</i> ), <i>B. subtilis</i>	Talco, trattamento dei semi, dispersione, spray fogliare, soluzione per bagnature	Vite, cotone, leguminose, patata, pomodoro, tabacco, cereali	Lotta contro gli agenti di oidio e peronospora, deperimento fogliare, filloptosi	Combat (BioAg Corporation, USA)
Batteri di varie specie, funghi di varie specie tra cui <i>Trichoderma</i>	Granuli, spray	Suoli	Competizione nutrizionale, soppressione della patogenicità	Nutri-Life 4/20 (Nutri-Tech, Australia). Non registrato come pesticida
<i>Gliocladium</i> spp.	In polvere	Orticole, erbacee	Promozione della crescita	Gliomix (Kemira Agro Oy, Finlandia; Fargro Ltd., UK)
<i>T. harzianum</i> , <i>T. koningii</i>	Trattamento dei semi, bagnatura del suolo in presemina	Culture serricole, vivai in pieno campo, ornamentali, colture erbacee	Lotta contro <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i>	Trichoderma (Euro Bio Consult, Olanda)

### **1.3. Microrganismi oggetto di indagine utili per il biocontrollo o il biorisanamento**

#### **1.3.1. Trichoderma spp.**

Il genere *Trichoderma* comprende funghi filamentosi anamorfici ampiamente studiati ed impiegati in agricoltura come agenti di biocontrollo per il loro efficace antagonismo contro patogeni terricoli e fogliari. Sono organismi terricoli a rapida crescita con conidi unicellulari verdi differenziati in fili di conidi portati da conidiofori poco differenziati. Studi approfonditi sulla morfologia e sulla biologia di questi funghi indicano che *Trichoderma* spp. è l'anamorfo dell'ascomicete *Hypocrea* che raramente è rinvenuto in natura (Cook e Baker, 1983).

Questi funghi, principalmente saprofiti e inclusi nel gruppo dei Deuteromiceti, formano un abbondante micelio con ife abbastanza ramificate costituite da cellule polinucleate, e sono presenti in tutti i suoli compresi quelli forestali e agricoli (Wardle *et al.*, 1993). Grazie alla produzione di una grossa varietà di enzimi depolimerizzanti, *Trichoderma* spp. sono capaci di utilizzare come fonte di carbonio e azoto un ampio gruppo di composti, tra cui monosaccaridi, disaccaridi, polisaccaridi complessi, purine, pirimidine, amminoacidi, tannini, catechine, aldeidi e acidi organici (Danielson e Davey, 1973). La sorgente di azoto preferibilmente utilizzata sembra sia l'azoto ammoniacale, anche se i funghi del genere *Trichoderma* sono capaci di utilizzare allo stesso modo urea e i nitrati.

Spesso questi funghi sono risultati essere colonizzatori secondari di sostanze organiche in decomposizione e di radici di piante in putrefazione, specialmente se danneggiate da altri funghi (Davet, 1979). Essi, ed in particolare le specie *T. atroviride* e *T. virens*, si sono mostrati efficaci nel controllo di numerose patologie delle piante. La capacità di utilizzare una vasta gamma di fonti di carbonio e di azoto, insieme all'abbondante produzione di conidi e all'adattabilità a diverse condizioni ambientali conferiscono a queste specie un'elevata competitività rispetto alla restante microflora del terreno. La capacità di competizione si unisce spesso alla produzione di metaboliti tossici e all'azione micoparassitica, rendendo questi microrganismi degli ottimi antagonisti di numerosi funghi patogeni di importanza economica (tabella 4).

**Tabella 4.** Funghi fitopatogeni controllati da diverse specie di *Trichoderma*.

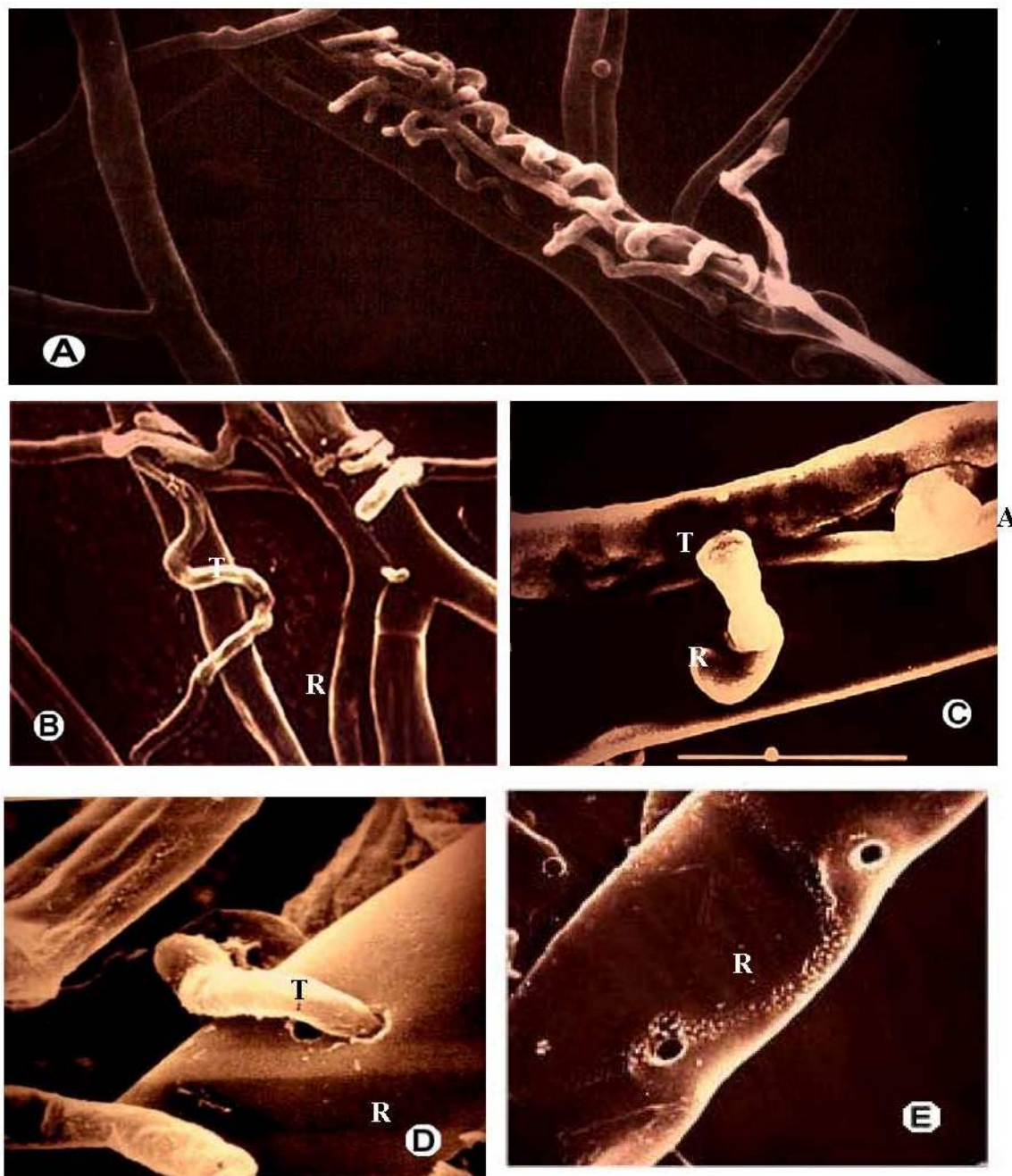
SPECIE DI <i>TRICHODERMA</i>	PIANTA TRATTATA	PATOGENO CONTROLLATO
<i>T. hamatum</i>	frumento e gramigna narciso solanacee, cotone, leguminose, barbabietola	patogeni vari <i>F. oxysporum</i> , <i>R. solani</i>
<i>T. harzianum</i>	aglio lattuga patata narciso, pomodoro cotone, melone, patata, lattuga, cotone, fagiolo patata, barbabietola pomodoro fruttiferi	<i>S. cepivorum</i> <i>P. ultimum</i> <i>S. sclerotiorum</i> <i>Phytophthora spp.</i> <i>F. oxysporum</i> <i>R. solani</i> <i>Verticillium spp.</i>
<i>T. koningii</i>	frumento e gramigna leguminose	patogeni vari <i>R. solani</i>
<i>T. viride</i>	lattuga narciso cotone, pomodoro	<i>P. ultimum</i> <i>F. oxysporum</i> <i>R. solani</i>

L'abilità competitiva di alcuni *Trichoderma* è dovuta, tra le altre cose, alla capacità di influenzare la disponibilità di alcuni nutrienti nella rizosfera, come ad esempio il ferro, sottraendolo ad altri funghi (Sivan e Chet, 1989). Alcuni, infatti, producono siderofori simili a quelli di *Pseudomonas* spp., anche se però non è stata ancora dimostrata alcuna relazione tra l'attività antagonista e la produzione di siderofori (Duijiff *et al.*, 1993; Buyens *et al.*, 1996).

I funghi del genere *Trichoderma* esplicano la loro attività di antibiosi attraverso la produzione di un vasto numero di metaboliti secondari ad attività antibiotica (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991; Sivasithamparam e Ghisalberti, 1998; Harman *et al.*, 2004a). I metaboliti secondari prodotti da *Trichoderma* spp. variano a seconda del ceppo considerato. Studi recenti hanno evidenziato che essi possono essere direttamente coinvolti nell'interazione *Trichoderma*-pianta (Vinale *et al.*, 2008a,b). Molti di questi antibiotici sono considerati importanti per l'efficacia del biocontrollo. Ad esempio la gliotossina sembra avere un ruolo importante nel biocontrollo messo in atto da *T. virens* nei confronti di *R. solani* e *P. ultimum* (Bisset, 1991; Wilhite *et al.*, 1994).

*Trichoderma* produce anche un'altra classe di composti antibiotici, i peptaiboli, che agiscono sinergicamente con gli enzimi degradativi della parete cellulare durante il micoparassitismo (Sivasithamparam e Ghisalberti, 1998; Reino *et al.*, 2007).

Il micoparassitismo sembra avere un ruolo primario nell'antagonismo di *Trichoderma*. Questo fenomeno complesso prevede prima l'accrescimento chemiotropico delle ife di *Trichoderma* verso le ife del fungo patogeno, probabilmente per effetto di un gradiente di essudati prodotti da quest'ultimo (Nordbring-Hertz e Chet, 1986), successivamente il fungo antagonista forma strutture specializzate simili ad appressori e ganci, che gli permettono di ancorarsi al fungo ospite. L'ultima fase, infine, prevede la completa degradazione delle strutture del fungo bersaglio (figura 7).



**Figura 7.** Immagini al microscopio elettronico di eventi di micoparassitizzazione messi in atto da *T. harzianum* (T) ai danni di *R. solani* (R). (A) e (B): tipica reazione di avvolgimento (coiling) con strutture ad uncino sviluppate attorno all'ifa dell'ospite; (C): particolare di strutture simili ad appressori (A) nell'interazione *Trichoderma*-patogeno; (D): perforazione dell'ifa di *R. solani*; (E): evidenza di fori su un'ifa di *R. solani* dalla quale *Trichoderma* è stato rimosso (foto da Elad *et al.*, 1983).

Si è ipotizzato che il riconoscimento coinvolga sia le lectine presenti sulla superficie dell'ospite (Nordbring-Hertz e Chet, 1986), sia molecole rilasciate per l'azione di enzimi degradativi; tra questi ricordiamo endochitinasi, chitobiosidasi, N-acetil- $\beta$ -glucosamminidasi, N-acetil- $\beta$ -galattosidasi,  $\beta$ -1,3-glucanasi,  $\beta$ -1,6-glucanasi, proteasi, DNAsi,  $\alpha$ -amilasi, cellulasi, mannanasi, xilanasi, ureasi, RNAsi, pectinasi, pectin-liasi, laccasi, perossidasi (Lorito, 1998). Chitinasi, glucanasi e proteasi vengono utilizzate per degradare la parete cellulare fungina e sono ritenuti composti chiave nel meccanismo di micoparassitismo e di biocontrollo in *T. harzianum* (Lorito *et al.*, 1993 a; Lorito e Woo, 1998; Woo *et al.*, 1999).

In aggiunta alla capacità di attaccare o inibire direttamente la crescita di agenti fitopatogeni, alcuni ceppi di *Trichoderma* interagiscono attivamente con la pianta promuovendone la crescita delle radici e del fusto (Harman *et al.*, 2004a). Gli effetti sulla pianta dei trattamenti del suolo con *Trichoderma*, a parte la lotta ai patogeni, consentono una migliore germinazione dei semi, una fioritura più rapida e prolifica, una maggiore crescita della pianta, un miglior sviluppo delle radici e un aumento della resa dei prodotti.

*Trichoderma* è anche in grado di interagire con funghi e batteri benefici. E' stato osservato che alcune specie di *Trichoderma* hanno un effetto sinergico con i PGPR (Plant Growth Promoter Rhizobacteria) e con funghi micorrizici (Calvet *et al.*, 1993). Formulati a base di *Trichoderma* spp. vengono utilizzati con successo in agricoltura contribuendo a ridurre le dosi di pesticidi chimici di sintesi e i rischi per la salute dell'uomo e dell'ambiente (Harman, 2000).

Negli ultimi anni è stata dimostrata anche la capacità di alcuni ceppi di *Trichoderma* di biodegradare o comunque tollerare una vasta gamma di inquinanti ambientali. In letteratura è riportato l'impiego di *Trichoderma* spp. nella bioremediation di suoli inquinati da idrocarburi (Harman *et al.*, 2004b). I ceppi di *Trichoderma* spp., in virtù delle loro peculiarità, sono usati anche in programmi di recupero di suoli; essendo microrganismi rizosfera-competenti, contribuiscono alla stabilità delle comunità microbiche nella rizosfera, controllano la microflora patogena e competitiva, migliorano la salute delle piante e aumentano lo sviluppo e la densità delle radici. Il ceppo T22 di *T. harzianum* ha trovato un impiego commerciale in questo campo perché aumenta notevolmente l'efficacia delle piante utilizzate per il fitorisanamento. Recenti studi hanno dimostrato che il trattamento delle radici di felci con *T. harzianum* ceppo T22 determina una drastica riduzione dei livelli di arsenico nei suoli contaminati ed un

significativo incremento della biomassa radicale, rispetto alle piante controllo (Harman *et al.*, 2004b).

Sono stati inoltre selezionati ceppi di *Trichoderma* resistenti al cianuro e capaci di detossificarlo (Harman *et al.*, 2004b; Ezzi e Lynch; 2002; Ezzi *et al.*, 2003); è stata inoltre dimostrata la capacità di tollerare elevate concentrazioni di rame (Vinale *et al.*, 2004).

La capacità di numerosi ceppi di *Trichoderma* di sopravvivere in presenza di composti tossici sembra sia attribuibile all'azione di specifiche proteine di membrana, i trasportatori ABC (ATP-Binding-Cassette) (Harman *et al.*, 2004a). Queste permeasi ATP-dipendenti giocano un ruolo chiave nei meccanismi di biocontrollo contro importanti funghi fitopatogeni e nella detossificazione di sostanze inquinanti presenti nell'ambiente (Ruocco *et al.*, 2008).

### **1.3.2. Drechslera spp.**

Questo genere comprende funghi terricoli a rapida crescita con conidi di forma cilindrica e di colore scuro. Studi approfonditi sulla morfologia e sulla biologia di questi funghi indicano che *Drechslera* spp. è l'anamorfo dell'ascomicete *Pyrenophora* (Agrios, 1998).

Alcune specie di *Drechslera* spp. sono note in letteratura come agenti di elmintosporiosi ai danni di svariate graminacee coltivate e spontanee (Matta, 1996). Solo di recente il ceppo 678 di *Drechslera* spp. è stato studiato come possibile agente di biocontrollo. E' stato osservato che tale ceppo avirulento, in associazione con le radici di una pianta australiana, la *Neurachne alopecuroidea*, è in grado di difendere tale pianta dall'azione di *G. graminis* var. *tritici*, agente causale del mal del piede del frumento (Kim *et al.*, 2006).

Il principale metabolita secondario prodotto da questo ceppo fungino ha mostrato *in vitro* attività antibiotica nei confronti non solo di *G. graminis* var. *tritici* ma anche di *R. solani*, *P. irregolare* e *A. alternata*. Inoltre, applicazioni radicali di questa molecola hanno evidenziato una sua azione di promozione della crescita su piantine di orzo (Kim *et al.*, 2006).

Quello del ceppo 678 non è il primo caso di un microrganismo avirulento utilizzato nel controllo biologico.

Ad esempio, nell'ambito della specie *F. oxysporum* sono state distinte 122 *formae speciales* e per ognuna diverse razze (patotipi) in base alla capacità di infettare diverse specie di piante. In natura esistono molte altre *formae speciales* che non sono in grado di causare fitopatie. Esse sono in genere isolati che vengono impiegati per la loro attività antagonistica nei confronti di funghi e fanerogame parassite e quindi utilizzati nella lotta biologica ed integrata (Gordon e Okamoto, 1992; Gordon e Martyn, 1997).

Per diverse specie vegetali è stata osservata una riduzione della colonizzazione delle radici da parte di *F. oxysporum* in presenza di ceppi non patogeni della stessa specie (Schneider, 1984; Mandeel e Baker, 1991; Eparvier e Alabouvette, 1994).

Un altro esempio è quello di *Pythium* spp. che comprende circa 80 specie di parassiti delle piante. Tuttavia, alcune di esse sono parassiti di altri funghi. *P. oligandrum*, ad esempio, è un micoparassita che può essere usato come un agente biologico nel controllo di diversi funghi patogeni quali *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytophthora* (Picard *et al.*, 2000), *G. graminis* (Deacon, 1976b), *R. solani* e di altre specie di *Pythium* (Berry *et al.*, 1993). *P. oligandrum* può crescere in associazione con le radici delle piante, comprese quelle di pomodoro e barbabietola da zucchero, indurre risposte di difesa contro altri funghi e batteri e stimolarne la crescita con la produzione di sostanze auxino-simili (Brozova, 2002; Picard *et al.*, 2000; Le Floch *et al.*, 2003; Vallance *et al.*, 2009). Ad oggi esistono in commercio anche alcuni prodotti a base di *P. oligandrum* (US. EPA, 2007).

### **1.3.3. Ceppi batterici isolati da siti contaminati dal Metil *tert*-butil etere**

I carburanti per autotrazione vengono addizionati di vari composti di sintesi, come eteri o alcoli, introdotti fin dai primi anni '70 per incrementare il numero di ottani, in sostituzione di composti più tossici usati in precedenza come il piombo tetraetile ed il piombo tetrametile (Stocking *et al.*, 2000). L'80% delle benzine attuali contiene Metil *tert*-butil etere (MtBE) come principale composto ossigenato in percentuali variabili da stato a stato (10-15% negli Stati Uniti, 1-10% in Europa). Il largo impiego di MtBE è legato alle sue proprietà chimico-fisiche, ad una modesta reattività che ne agevola la gestione ed il trasporto e ad un costo relativamente basso.

Le concentrazioni di MtBE solitamente riscontrate nell'ambiente non costituiscono un pericolo diretto per la salute umana; tuttavia, prove di esposizione cronica su animali da



laboratorio e l'incertezza circa la potenziale cancerogenicità per l'uomo hanno portato molti paesi ad individuare per questa sostanza concentrazioni di riferimento (U.S. EPA, 1999). L'EPA ha indicato 20-40 µg/l come range di concentrazione massima auspicabile nelle acque ad uso potabile.

Per molto tempo il MtBE è stato ritenuto biologicamente recalcitrante (Fujiwara *et al.*, 1984; Jensen e Arvin, 1990; Suflita e Mormile, 1993; Yeh e Novak, 1995). Studi più recenti hanno invece dimostrato la capacità da parte di vari microrganismi batterici e fungini di degradare questa sostanza in condizioni aerobiche ed anaerobiche (Salanitro *et al.*, 1994; Eweis *et al.*, 1997; Mo *et al.*, 1997; Park e Cowan, 1997; Hanson *et al.*, 1999) o mediante cometabolismo (Hardison *et al.*, 1997; Steffan *et al.*, 1997; Garnier *et al.*, 1999; Hyman *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2003).

La biodegradazione del MtBE in ambiente anaerobico è stata evidenziata in un numero limitato di studi. Finneran e Lovley (2000) hanno riscontrato una degradazione in sedimenti dopo l'aggiunta di sostanze umiche e Fe(III), mentre nel lavoro di Somsamak *et al.* (2001) il MtBE è stato degradato in condizioni solfato-riducenti, con colture microbiche derivate da sedimenti contaminati. Kropp e collaboratori (2000), infine, hanno evidenziato la degradazione di tale inquinante in condizioni metanogeniche.

In condizioni aerobiche, il MtBE può essere degradato essenzialmente mediante due tipi di metabolismo:

- Metabolismo diretto: possono essere coinvolte sia colture miste sia colture pure. In letteratura viene riportata la capacità di una coltura pura di *Rhodococcus* SC100 di degradare elevate concentrazioni di MtBE (Salanitro *et al.*, 1996); colture batteriche di *Hydrogenophaga flava* ENV735 crescono in presenza del MtBE e riescono a degradarlo rapidamente in seguito all'aggiunta di lievito (Steffan *et al.*, 1997). Infine, *M. austroafricanum* IFP2012 si è dimostrato in grado di mineralizzare il MtBE quando questo è presente come unica fonte di energia (François *et al.*, 2002).
- Cometabolismo: diverse sostanze (alcani, composti monocromatici, composti ciclici, etc.) possono essere utilizzate come substrati primari. In generale, la degradazione in cometabolismo del MtBE appare associata frequentemente a microrganismi che crescono aerobicamente su alcani a catena corta (U.S. EPA, 2001). Tra i microrganismi che utilizzano il cometabolismo si ricordano ceppi fungini appartenenti al genere *Graphium* sp. in grado di degradare il MtBE crescendo su propano (Hardison *et al.*,

1997); *Xanthobacter* e *M. vaccae* in grado di crescere su n-butano, n-pentano ed n-esano (Hyman *et al.*, 1998a; Smith *et al.*, 2003); *P. aeruginosa* in grado di cometabolizzare il MtBE anche ad elevate concentrazioni dell'inquinante (Garnier *et al.*, 1999).

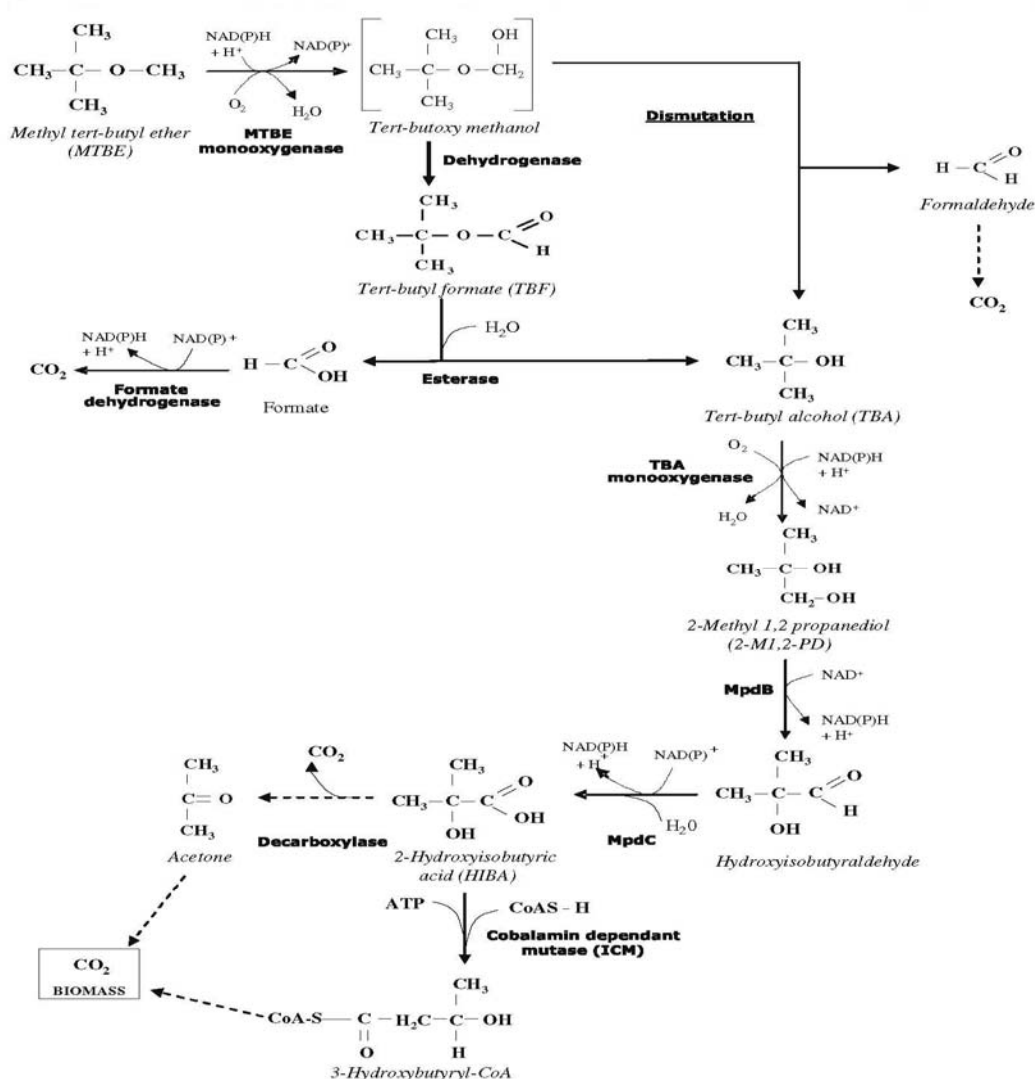
In tabella 5 sono riportati alcuni esempi di microrganismi in grado di degradare il MtBE (Deeb *et al.*, 2000).

**Tabella 5.** Esempi di colture microbiche in grado di biodegradare il MtBE.

COLTURA MICROBICA	FONTE	TIPO DI METABOLISMO	RAPPORTO DI DEGRADAZIONE DEL MtBE	REFERENZA
Colture miste BC-1	Recuperi dell'industria chimica	Substrato primario, metabolismo diretto	34 mg/g cell/h	Salanitro <i>et al.</i> , 1994
<i>Methylobacterium mesophilicum</i> (ATCC70007) <i>Rhodococcus</i> (ATCC700108) <i>A. ilicis</i>	Isolati da frutti dell'albero di Ginko	Metabolismo diretto	0,18 mg/L	Mo <i>et al.</i> , 1997
Colture miste	Filtri utilizzati in impianti di biorecupero	Substrato primario, metabolismo diretto	10 mg/g cell/h	Fortin e Deshusses, 1999a,b
<i>Rubrivivax</i> sp. PM1	Filtri usati nella biodegradazione del MtBE	Substrato primario, metabolismo diretto	50 mg/g cell/h	Deeb, 1999
<i>Graphium</i> sp. (ATCC58400)	Coltura proveniente dall'ossidazione dell' n-butano e dell'n-esano	Cometabolismo, parziale degradazione	0,92 mg/g cell/h	Hardison <i>et al.</i> , 1997
<i>Xanthobacter</i> sp. <i>M. vaccae</i>	Colture ossidanti l'n-/iso alcano	Cometabolismo, degradazione completa	43,6 mg/g cell/h	Hyman <i>et al.</i> , 1998 Hyman e O'Reilly, 1999
ENV425 ENV421	Colture pure ossidanti il propano	Cometabolismo, degradazione completa	26,7 mg/g cell/h	Steffan <i>et al.</i> , 1997
<i>P. aeruginosa</i>	Colture ossidanti il propano da suoli contaminati da benzine	Cometabolismo, degradazione completa	11,3 mg/g cell/h	Garnier <i>et al.</i> , 1999
PEL-B201	Colture pure ossidanti il benzene	Cometabolismo	0,33 mg/g cell/h	Koenigsberg <i>et al.</i> , 1999

Molti studi hanno evidenziato che gli enzimi chiave responsabili della degradazione del MtBE appartengono principalmente alla classe delle monoossigenasi, come il citocromo P450 e l'alcool deidrogenasi (Hardison *et al.*, 1997; Steffan *et al.*, 1997; Hyman *et al.*, 1998; Ferreira e Fayolle, 2006).

Gli intermedi di reazione *tert*-butil alcool (TBA) e il *tert*-butil formato (TBF), che si producono durante l'ossidazione del MtBE, sono i composti chiave nella degradazione di questo etere in CO<sub>2</sub> (Le Gal *et al.*, 2001; Rosell *et al.*, 2006; Martienssen *et al.*, 2006). In figura 8 sono schematizzati i tre differenti pathways metabolici relativi alla degradazione microbica del MtBE.



**Figura 8.** Differenti pathways metabolici relativi alla degradazione microbica del MtBE.

Buona parte di questi agenti di biorisanamento sono noti in letteratura anche per la loro capacità di indurre resistenza e favorire la crescita delle piante. Batteri dei generi *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Agrobacterium* sono i più studiati come agenti di biocontrollo. Negli ultimi 20 anni, molti studi hanno dimostrato inequivocabilmente che antibiotici, enzimi e sostanze volatili prodotti da questi microrganismi giocano un ruolo chiave nel controllo di molte malattie delle piante (Weller, 1988; Whipps, 1997).

Per esempio, la pirrolnitrina prodotta da alcune specie di *Pseudomonas* e *Burkholderia* ha mostrato attività verso un ampio range di Basidiomiceti, Deuteromiceti e Ascomiceti che includono importanti patogeni quali *R. solani*, *B. cinerea*, *V. dahliae* e *S. sclerotiorum* (Ligon *et al.*, 2000). Inoltre, la pirrolnitrina è risultata attiva anche contro alcuni batteri Gram-positivi, in particolare *Streptomyces* spp. (El-Banna e Winkelmann, 1998).

Anche la zwittermicina A, un antibiotico prodotto da *B. cereus* e *B. thuringiensis*, favorisce la crescita delle piante ed ha attività verso un ampio spettro di microrganismi, inclusi funghi fitopatogeni quali *Phytophthora* e alcune specie di *Pythium* (Silo-Suh *et al.*, 1994, 1998).

## 1.4. Scopo della tesi

Numerose specie di funghi e batteri sono state proposte come valida alternativa all'utilizzo di pesticidi chimici di sintesi in agricoltura e, nello stesso tempo, grazie alla loro intrinseca capacità di adattarsi alle condizioni ambientali più svariate, esse possono risultare degli ottimi decontaminanti di suoli e acque inquinate da sostanze tossiche. La duplice esigenza di trovare, quindi, soluzioni eco-compatibili in grado di offrire un'elevata protezione dalle fitopatie, ed al tempo stesso di favorire il risanamento dei suoli, anche evitando l'accumulo di inquinanti nelle produzioni agricole, hanno promosso negli ultimi decenni numerose ricerche nel campo del controllo biologico e del biorisanamento.

L'obiettivo di questo lavoro è dunque quello di promuovere lo sviluppo di nuovi prodotti a base di microrganismi o loro estratti, che siano in grado allo stesso tempo di proteggere la pianta dalla presenza sia di patogeni sia di inquinanti antropici.

In virtù delle loro caratteristiche e delle loro potenzialità, sono stati selezionati ed utilizzati nelle fasi operative di questa ricerca diversi microrganismi sia di origine fungina sia batterica. In particolare, è stata saggiata la loro capacità di degradazione di un importante contaminante antropico quale il Metil *tert*-butil etere (MtBE), noto per essere un comune additivo dei carburanti derivati dal petrolio, ma dotato di elevata idrosolubilità e potenziale tossicità per l'uomo. Il problema derivante dalla contaminazione delle acque di falda ad opera del MtBE potrebbe, almeno in parte, essere risolto mediante l'utilizzo combinato di tecniche fisiche, chimiche e biologiche di bonifica. Nell'ambito dei sistemi di natura biologica di decontaminazione un primo passo richiede la selezione di opportuni consorzi microbici atti a trasformare questo composto in derivati meno tossici. Sfruttando perciò il metabolismo microbico sarebbe possibile depurare le aree contaminate mediante metodiche poco o nulla invasive e a costi relativamente bassi.

I microrganismi oggetto del presente lavoro di tesi sono stati:

- + ceppi batterici isolati da siti contaminati da idrocarburi;
- + un fungo appartenente al genere *Drechslera*, definito *Black mycelium*, ceppo 678;
- + il ceppo T22 di *T. harzianum*.

In una prima fase del lavoro, i ceppi batterici provenienti da alcuni siti contaminati da idrocarburi sono stati isolati e caratterizzati morfologicamente e geneticamente. Successivamente sono stati allestiti saggi *in vitro* per selezionare i microrganismi (sia i batteri isolati dai suoli contaminati, sia i suddetti funghi allevati in coltura axenica) con potenziali capacità degradative dell'inquinante in esame (MtBE). Gli stessi microrganismi sono stati saggiati *in vitro* ed *in vivo* anche per valutarne le rispettive capacità di biocontrollo e di induzione di resistenza sistemica (ISR) in pianta, che risultavano ben note solo nel caso del ceppo T22 di *T. harzianum*. Quest'ultimo, difatti, è un noto antagonista di numerosi agenti fitopatogeni (inserito quale ingrediente attivo di diversi biofitofarmaci e biofertilizzanti), ma è stato descritto anche come agente di biorisanamento di suoli contaminati da metalli pesanti e cianuro-derivati. Il suo utilizzo nell'ambito di questo lavoro ha avuto lo scopo di valutare la capacità di T22 di degradare concentrazioni crescenti di MtBE, per proporne l'utilizzo in progetti di biorisanamento che vedono coinvolti questo contaminante.

Allo scopo, infine, di valutare quali potessero essere i fattori molecolari coinvolti nel biocontrollo operato dai ceppi selezionati, si è voluto procedere con l'isolamento, la purificazione e la caratterizzazione chimica e biologica dei principali metaboliti secondari prodotti dai microrganismi in esame. L'attività antibiotica di questi composti è stata valutata tramite saggi di antibiosi *in vitro* nei confronti di vari funghi fitopatogeni.

## 2. MATERIALI E METODI

---

### 2.1. Ceppi utilizzati

I microrganismi utilizzati in questo lavoro sono riportati in tabella 6.

MICRORGANISMI UTILIZZATI	PROVENIENZA
<b><u>Ceppi fungini antagonisti</u></b> <ul style="list-style-type: none"><li>♦ <i>Trichoderma harzianum</i> T22</li><li>♦ <i>Drechslera</i> spp., ceppo 678</li></ul>	T22 fornito dalla micoteca del Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale della Facoltà di Agraria di Portici; <i>Drechslera</i> spp, ceppo 678 isolato dalle radici di una pianta australiana, <i>Neurachne alopecuroidea</i> .
<b><u>Ceppi fungini patogeni</u></b> <ul style="list-style-type: none"><li>♦ <i>Rhizoctonia solani</i></li><li>♦ <i>Pythium ultimum</i></li><li>♦ <i>Alternaria alternata</i></li><li>♦ <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></li><li>♦ <i>Botrytis cinerea</i></li></ul>	Forniti dalla micoteca del Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale della Facoltà di Agraria di Portici.
<b><u>Ceppi batterici antagonisti</u></b> <ul style="list-style-type: none"><li>♦ <i>Bacillus</i> sp. ceppo R1B</li><li>♦ <i>Thiobacillus</i> sp. ceppo R8b</li><li>♦ <i>Mycobacterium mucogenicum</i> ceppo R8i</li></ul>	Isolati e caratterizzati presso il Dipartimento di microbiologia della Facoltà di Scienze degli Alimenti di Portici.

**Tabella 6.** Ceppi batterici e fungini utilizzati nel presente lavoro e loro provenienza.



Le spore dei ceppi fungini sopra elencati sono state prelevate in opportune condizioni di sterilità e inoculate su terreno di coltura PDA (Potato Dextrose Agar) o MEP (malt extract + mycological peptone), nel caso di *B. cinerea*. Le colture sono state incubate a 25° C fino ad ottenere una completa sporulazione. Le spore sono state raccolte utilizzando 10 mL di acqua distillata sterile per piastra, quindi filtrate con lana di vetro per allontanare i residui di micelio, sciacquate con acqua distillata sterile, contate e conservate a -20°C in una soluzione di glicerolo 20% (v/v) fino al loro utilizzo. La concentrazione dei conidi per l'inoculo è stata determinata utilizzando un contaglobuli Bright-line® (Sigma).

*Drechslera* spp. ceppo 678 è stato prima accresciuto su piastre di PDA, incubato a 25°C e poi conservato in tubi a becco di clarino con l'aggiunta di olio minerale.

I ceppi batterici sono stati allevati in coltura liquida PCB (Plate Count Broth, OXOID) ed incubati a 30° C per 2 giorni. Una goccia della sospensione batterica è stata successivamente trasferita su terreno di coltura PCA (Plate Count Agar, OXOID). I ceppi di batteri sono stati conservati a 4 °C.

Tutti i reattivi utilizzati in questo lavoro sono forniti dalla Sigma (St Louis, Mo., USA) se non diversamente specificato.

## **2.2. Terreni di coltura**

- PDA (Potato Dextrose Agar)
- PDB (Potato Dextrose Broth)
- LB (Luria Bertani Broth)
- LBA (Luria Bertani Agar)
- PCA (Plate Count Agar)
- PCB (Plate Count Broth)
- MEP (Malt Extract + Mycological Peptone)
- SM (Salt Medium) pH 6.6 costituito da:

<i><b>Sali</b></i>	<i><b>Concentrazione</b></i>
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	680 mg/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	870 mg/l
KCL	200 mg/l
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1 g/l
$\text{FeSO}_4$	2 mg/l
$\text{ZnSO}_4$	2 mg/l
$\text{MnSO}_4$	2 mg/l
$\text{CaCl}_2$	200 mg/l
$\text{MgSO}_4$	200 mg/l

- FTW mineral salts solution costituito da :

<i><b>Sali</b></i>	<i><b>Concentrazione</b></i>
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	225 mg/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	225 mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	225 mg/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg/l
$\text{CaCO}_3$	5 mg/l
$\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	5 mg/l

### **2.3. Ceppi batterici**

#### **2.3.1. Isolamento di ceppi batterici da siti contaminati da idrocarburi**

I microrganismi batterici presenti nei campioni prelevati da siti contaminati da idrocarburi sono stati isolati su due diversi substrati: Plate Count Agar (PCA) e un substrato contenente come unica fonte di nutrienti il MtBE. Le colonie isolate, mostranti differente morfologia sui substrati solidi, sono state prelevate e purificate sugli stessi substrati di isolamento. A tal fine sono state effettuate ripetute purificazioni utilizzando la tecnica dello striscio su piastra sugli stessi substrati di crescita.

### **2.3.2. Identificazione fenotipica e molecolare**

Gli isolati microbici ottenuti dall'isolamento su substrato solido sono stati sottoposti a identificazione fenotipica e molecolare.

#### **2.3.2.1. Identificazione fenotipica di ceppi batterici**

Una volta ottenute delle colonie pure, la morfologia degli isolati è stata evidenziata mediante osservazione al microscopio ottico di preparati a fresco e colorati. Questo tipo di indagine ha consentito di riconoscere la morfologia e la struttura cellulare propria di ogni isolato microbico.

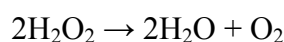
Le caratteristiche rilevate sono state la dimensione, la forma, i margini, il colore e la consistenza delle colonie. Queste ultime sono state successivamente sottoposte alla reazione di Gram e al saggio della catalasi.

##### **2.3.2.1.1. Colorazione di Gram**

È possibile distinguere i batteri Gram-negativi da quelli Gram-positivi con un test rapido che utilizza una soluzione alcalina per studiare la resistenza delle due diverse pareti cellulari. Il test della colorazione di Gram consiste nel porre una goccia di soluzione di KOH al 3% su un vetrino e, prelevata una colonia da una coltura pura, la si sospende con un movimento circolare nella goccia. A questo punto si può osservare la positività del test se, sollevando l'ansa, si forma un filamento vischioso di soluzione. La sospensione batterica composta da Gram-negativi assume tale consistenza a causa della rottura della parete cellulare e della dispersione del DNA. Parallelamente, il risultato del test sarà negativo se, alzando l'ansa, non si formerà nulla tra la sua estremità e la sospensione batterica, rilevando pertanto la presenza di batteri Gram-positivi.

### 2.3.2.1.2. Saggio della catalasi

Questo saggio permette di rilevare la presenza dell'enzima catalasi che catalizza la distruzione del perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) secondo la reazione:



A tal fine, dopo aver prelevato una colonia batterica da una coltura pura la si stempera in una goccia di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. La reazione sarà positiva se si forma una schiuma bianca, dovuta dalla liberazione d'ossigeno secondo la reazione di cui sopra; sarà negativa se non si formano bolle.

### 2.3.2.2. Estrazione del DNA e PCR

Il DNA è stato estratto mediante InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Il surnatante contenente il DNA è stato conservato a -20°C. Tutti gli isolati sono stati successivamente sottoposti a sequenziamento del 16S rDNA.

1 µl della miscela è stato utilizzato come template per l'amplificazione tramite PCR.

Per amplificare il 16S rDNA sono stati utilizzati i seguenti primers (Weisburg *et al.*, 1991):

fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')

corrispondenti, rispettivamente, alle posizioni 8-17 e 1540-1524 di *Escherichia coli*.

Le soluzioni della PCR sono state preparate come riportato da Blaiotta *et al.* (2002).

Il ciclo termico utilizzato è stato il seguente:

- |                             |      |         |
|-----------------------------|------|---------|
| ♦ Amplificazione (30 cicli) |      |         |
| ♦ Denaturazione iniziale    | 94°C | 1 min.  |
| ♦ Annealing (allineamento)  | 54°C | 45 sec. |
| ♦ Allungamento              | 72°C | 2 min.  |
| ♦ Allungamento finale       | 72°C | 7 min.  |

La presenza dei prodotti di PCR è stata verificata tramite elettroforesi in gel d'agarosio (2 % w/v) a 100V per 2 ore, purificati mediante QIAquick gel extraction kit (Qiagen S. p. A., Milan) e sequenziati con il primer V3r (Muyzer *et al.*, 1993).

Le sequenze di DNA sono state determinate utilizzando il DNA sequencing kit (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA) secondo le istruzioni. Le sequenze sono state analizzate mediante MacDNasis Pro v3.0.7 (Hitachi Software Engineering Europe S. A., Olivet Cedex, F) e confrontate con quelle contenute in banca dati GenBank and EMBL database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1997).

### **2.3.3. Crescita di ceppi batterici in presenza di MtBE e degradazione dell'inquinante**

I ceppi batterici isolati sono stati allevati in coltura liquida (PCB) ed incubati a 30°C per 2 giorni. Successivamente, 50 µl di ciascuna sospensione cellulare sono stati inoculati in 5 ml di FTW (mezzo minimo di sali ed oligoelementi) addizionato con 50 ppm di MtBE come unica fonte di carbonio. Le sospensioni batteriche sono state lasciate in agitazione a 25 °C e 150 rpm. Ciascun campione è stato prelevato a 7 e 14 giorni, estratto con cloroformio (1:1 v/v) e sottoposto ad analisi gascromatografica (GC/FID - gascromatografia/rilevatore FID) per valutare la capacità di ciascun ceppo batterico di degradare il MtBE.

In seguito, i ceppi batterici selezionati per la maggiore capacità degradativa sono stati nuovamente inoculati in FTW in presenza di concentrazioni crescenti di inquinante (50 ppm, 100 ppm e 500 ppm) ed incubati a 25°C e 150 rpm per 7 giorni. La capacità di degradare il MtBE è stata valutata mediante analisi GC/FID.

Il gascromatografo utilizzato per queste analisi è un GC 17, Shimadzu dotato di "flame ionization detector" (FID) ed equipaggiato con una colonna lunga 30 metri e con un diametro interno di 0,53 mm. Per ognuno dei ceppi batterici è stata valutata anche la capacità di crescita in mezzo contaminato da MtBE alle diverse concentrazioni (50 ppm, 100 ppm e 500 ppm) mediante conta delle unità formanti colonie (UFC). In particolare, 1 ml di ciascuna sospensione di batteri è stato vortexato e sottoposto a diluizioni seriali decimali. 100 µl delle diluizioni  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  sono stati piastrati su PCA e incubati a 30°C. La conta delle UFC è stata effettuata ai tempi 0, 3, 5 e 7 giorni.

#### **2.3.4. Saggi di antagonismo *in vitro* nei confronti di funghi fitopatogeni**

Al fine di verificare l'attività antagonista dei 3 ceppi batterici selezionati sono stati allestiti saggi *in vitro* nei confronti dei patogeni terricoli *R. solani* e *P. ultimum* e dei patogeni fogliari *B. cinerea* e *A. alternata*.

R1B, R8b e R8i sono stati inoculati su piastre di LBA e lasciati in incubazione a 28°C per 3 giorni. Successivamente, da ogni piastra, sono state prelevate due colonie per ciascun ceppo e stemperate in 500 µl di acqua sterile.

50 µl di ogni soluzione sono stati inoculati su piastre di PDA. Le piastre sono state lasciate in incubazione a 28°C e dopo 24 ore è stato trasferito un dischetto di micelio di 0.5 cm prelevato al margine delle colonie fungine allevate su PDA.

La capacità antagonista di ogni ceppo batterico è stata valutata in base all'ampiezza dell'alone di inibizione formatasi in seguito alla crescita dei due microrganismi (antagonista e patogeno) come descritto da Whipps, 1987.

#### **2.3.5. Saggi di biocontrollo *in vivo* nei confronti dei patogeni fogliari *B. cinerea* e *A. alternata***

Semi di pomodoro (*Lycopersicum esculentum* cv. Marmande) sono stati disinfettati con ipoclorito di sodio all'1% per 2 minuti, risciacquati 3 volte con acqua sterile e poi lasciati germinare in terreno sterile. Sulle foglie sono stati spruzzati 3 ml di una sospensione  $1 \times 10^7$  CFU/ml di batteri cresciuti in LB a 28°C in agitazione per 16 ore. Successivamente, le stesse foglie sono state inoculate con 10 µl di sospensione conidica del patogeno in tampone di germinazione (soluzione 20 mM di fosfato di potassio e 20 mM di glucosio) avente una concentrazione di  $1 \times 10^6$  spore/ml.

La sospensione conidica è stata ottenuta allevando *B. cinerea* su piastre Petri contenenti MEP e *A. alternata* su piastre Petri contenenti PDA alla temperatura di 25°C.

Dopo 10 giorni il micelio ed i conidi ottenuti sono stati raccolti, filtrati con lana di vetro e lavati con acqua sterile. Il filtrato è stato centrifugato in modo da raccogliere i conidi, successivamente risospesi in tampone di germinazione alla concentrazione di lavoro.

Sono state previste quattro repliche per ogni trattamento e, come controlli sono state allestite le condizioni: piante non trattate, piante trattate solo con il patogeno e piante trattate solo con l'antagonista.

I vasi sono stati coperti con buste di plastica trasparenti inumidite con H<sub>2</sub>O per ottenere un microclima saturo di umidità e condizioni favorevoli allo sviluppo della malattia. Le piante sono state mantenute in camera di crescita ad una temperatura di 18°C. Per la valutazione dei saggi sono state calcolate le aree delle necrosi (esprese in mm<sup>2</sup>) apparse sulle foglie 48, 72 e 96 ore dopo l'inoculo del patogeno.

### **2.3.6. Saggi di biocontrollo *in vivo* nei confronti del patogeno terricolo *P. ultimum***

Il saggio è stato realizzato utilizzando semi di pomodoro (*Lycopersicum esculentum* cv. Marmande). Questi sono stati prima sterilizzati con ipoclorito di sodio all'1 % per 2 minuti, quindi lavati abbondantemente con acqua distillata sterile. Il patogeno è stato allevato per 15 giorni alla temperatura di 25°C in coltura agitata (150 rpm) di PDB.

La biomassa prodotta è stata filtrata con dischi di carta Miracloth sterili e lavata con acqua sterile; è stata quindi uniformemente distribuita nel terreno sterile alla dose di 3 g/Lt di terreno. I semi sono stati trattati con 1 ml di una sospensione 1x10<sup>7</sup> CFU/mL di ciascun ceppo batterico, trapiantati nel terreno precedentemente infettato e lasciati in camera di crescita condizionata a 22°C, con una luminosità di 5000 lux e un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Sono state previste quattro repliche per ogni trattamento e come controlli sono state allestite le condizioni: piante non trattate, piante trattate solo con il patogeno e piante trattate solo con l'antagonista. La valutazione della malattia è stata effettuata 7 e 13 giorni dopo la semina conteggiando il numero dei semi germinati e misurando l'accrescimento radicale delle piantine.

### **2.3.7. Saggi di Induzione di Resistenza (ISR)**

Al fine di verificare la capacità dei ceppi batterici selezionati di indurre Resistenza Sistemica (ISR) nella pianta ospite sono stati allestiti saggi *in vivo* nei confronti del patogeno fogliare *B. cinerea*.

Sono stati, pertanto, fatti germinare semi sterilizzati di pomodoro (*Lycopersicum esculentum* cv. Marmande) in terreno sterile. Sulle foglie vere del palco inferiore sono

stati spruzzati 3 ml di una sospensione  $1 \times 10^7$  CFU/ml di ciascun ceppo batterico, cresciuto in LB a 28°C in agitazione a 150 rpm per 16 ore. Successivamente, le foglie di un palco superiore a quello precedentemente trattato con i batteri sono state inoculate con 10 µl una sospensione conidica del patogeno in tampone di germinazione avente una concentrazione di  $1 \times 10^6$  spore/ml.

In tutti i saggi sono state previste quattro repliche per ogni trattamento e, come controlli sono state allestite le condizioni: piante non trattate, piante trattate solo con il patogeno e piante trattate solo con l'antagonista. I vasi sono stati coperti con buste di plastica trasparenti inumidite con H<sub>2</sub>O per ottenere un microclima saturo di umidità e condizioni favorevoli allo sviluppo della malattia. Le piante sono state mantenute in camera di crescita ad una temperatura di 18° C. Per la valutazione dei saggi sono state calcolate le aree delle necrosi (esprese in mm<sup>2</sup>) apparse sulle foglie 48, 72 e 96 ore dopo l'inoculo del patogeno.

### **2.3.8. Isolamento e caratterizzazione dei metaboliti secondari prodotti dai ceppi batterici selezionati**

Ogni ceppo batterico è stato inoculato in due beute da 5 L contenenti ciascuna 2 L di LB. Le beute sono state incubate per 15 giorni a 25° C in agitazione a 150 rpm. Le colture sono state centrifugate per 15 minuti a 10000 rpm per eliminare le cellule batteriche.

Il filtrato colturale è stato estratto esaustivamente con acetato di etile (EtOAc). Le frazioni organiche raccolte sono state unite e anidificate con l'aggiunta di Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Successivamente il solvente è stato allontanato mediante evaporazione a pressione ridotta ad una temperatura di 35° C. Il residuo oleaginoso ottenuto dal filtrato colturale di ciascun ceppo batterico è stato analizzato mediante TLC (Si gel, Kieselgel 60, GF254 di 0,25 mm, Merck, Darmstadt; Germany) utilizzando quale sistema eluente EtOAc:etere di petrolio in rapporto 8:2 v/v o cloroformio:metanolo 9:1 v/v. I composti sono stati rilevati con raggi UV (254 o 366 nm) e/o nebulizzando le TLC con CeSO<sub>4</sub> (10% w/v in acqua) o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5% v/v in etanolo) e riscaldate a 110° C per 10 minuti.

L'estratto organico è stato successivamente separato mediante cromatografia su colonna a pressione atmosferica (lunghezza 1.30 m; diametro: 4 cm) di gel di silice; le fasi eluenti impiegate sono state in successione: cloroformio:metanolo (8:2 v/v),



cloroformio:metanolo (9:1 v/v), ed infine metanolo (MeOH 100%). L'andamento cromatografico è stato monitorato mediante cromatografia su strato sottile (TLC- Thin-Layer-Chromatography) su lastre di gel di silice eluite con cloroformio:metanolo (9:1 v/v).

Le frazioni omogenee ottenute dall'analisi cromatografica sono state purificate attraverso TLC preparativa utilizzando come sistema eluente ancora cloroformio:metanolo (9:1 v/v). L'andamento cromatografico è stato seguito mediante TLC a fase inversa (RP18 TLC – Merck) eluite con cloroformio:metanolo 9:1 v/v ed analizzate mediante esposizione a lampada UV o a vapori di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% in etanolo e successiva introduzione in stufa a 70° C. La caratterizzazione dei metaboliti, effettuata presso la University of Western Australia, è stata realizzata mediante analisi degli spettri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C ottenuti con uno spettrometro Bruker AM 600 operante a 600 (<sup>1</sup>H) e 125 (<sup>13</sup>C) MHz utilizzando come standard di riferimento il picco di solventi deuterati e residuali. Gli spettri di massa sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro di massa LC/MS (Agilent 6330 Ion Trap). Spettri di massa ad alta e bassa risoluzione sono stati ottenuti con con spettrometro di massa VG Autospec (EI mode).

Le cromatografie su colonna sono state effettuate mediante gel di silice Merck, Kiesegel 60 (0.063-0.2 mm). I solventi ed i reattivi utilizzati sono tutti della Fluka (A.G. Bush, Svizzera) se non altrimenti indicato.

### **2.3.9. Saggi di antibiosi *in vitro* nei confronti di funghi fitopatogeni**

Il principale metabolita secondario purificato dal ceppo R8b è stato saggiato nei confronti dei patogeni *P. ultimum*, *A. alternata*, *B. cinerea* e *R. solani* al fine di valutare le sue proprietà antibiotiche.

Dischetti di agar di 5 mm di diametro prelevati dal micelio in crescita dei patogeni citati sono stati posti al centro di piastre contenenti PDA 1/5. Sopra ogni dischetto sono stati applicati 10 µl del metabolita purificato in un *range* di concentrazione da 1 a 100 µg per dischetto. Il controllo è stato ottenuto applicando 10 µl di solo sovente.

Come riportato da Almassi *et al.* (1991) il solvente è stato fatto evaporare sotto cappa a flusso laminare e le piastre incubate a 25° C. La crescita del diametro (cm) dei patogeni è stata misurata quotidianamente. Ogni trattamento consiste di tre replicati e l'esperimento è stato ripetuto due volte.

## **2.4. Drechslera spp.**

### **2.4.1. Estrazione del DNA dal ceppo 678 di *Drechslera* spp.**

Il DNA genomico è stato ottenuto mediante estrazione con fenolo-cloroformio a partire da micelio allevato in coltura agitata in PDB per 72 ore alla temperatura di 24° C. La biomassa è stata raccolta separando il substrato per filtrazione con carta Miracloth (Calbiochem), lavata ripetutamente con acqua distillata sterile e asciugata con carta assorbente. Il micelio è stato dapprima immerso in azoto liquido e poi liofilizzato.

La biomassa liofilizzata è stata polverizzata con l'ausilio di un mortaio e pestello e immediatamente sottoposta ad estrazione. Un grammo di micelio liofilizzato è stato sospeso in 10 ml di tampone di estrazione (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 1% pH 7.5), al quale sono stati aggiunti 5ml di fenolo e 5 ml di cloroformio-alcool isoamilico (24:1). La sospensione è stata agitata delicatamente e quindi centrifugata a 4° C per 30 minuti a 12000 rpm. La fase acquosa recuperata è stata digerita con 50µl di RNasi (10 mg/ml) per 1 ora a 37° C.

Terminata la digestione sono stati aggiunti 10 ml di fenolo-cloroformio, il campione è stato agitato delicatamente e centrifugato nuovamente. La fase acquosa è stata sottoposta ad una nuova estrazione fenolo-cloroformio e ad una con solo cloroformio. Alla fase acquosa recuperata (contenente il DNA genomico) è stato aggiunto isopropanolo e il tutto è stato centrifugato a temperatura ambiente per 15 minuti. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo al 70%, lasciato asciugare e poi risospeso in TE (Tris 10 mM - EDTA 10 mM pH 8.0). Il DNA ottenuto è stato quantificato tramite elettroforesi in gel d'agarosio per comparazione con un DNA standard.

### **2.4.2. Amplificazione tramite PCR**

Le reazioni polimerasiche sono state eseguite utilizzando come template il DNA genomico del ceppo 678 di *Drechslera* spp. I primers utilizzati e le relative sequenze sono elencate di seguito:

rSR6 (5'AAGTAGAAGTCGTAACAAGG3')

fLR1 (5'GGTTGGTTTCTTTTCCT3')

Per la reazione di PCR è stato utilizzato un volume totale di 50 µl ed è stato seguito il seguente protocollo:

COMPONENTI DELLA REAZIONE	CONCENTRAZIONI FINALI
Taq polimerasi	0,5µl
buffer Green 5x	10µl
DNTPs 2,5 mM	4µl
DNA	1µl
Primer	2µl
Acqua	30,5µl

Il ciclo termico utilizzato è stato il seguente:

- |                                      |      |         |
|--------------------------------------|------|---------|
| ♦ Denaturazione iniziale (hot start) | 94°C | 1 min.  |
| ♦ Amplificazione (30 cicli)          |      |         |
| ♦ Denaturazione iniziale             | 94°C | 1 min.  |
| ♦ Annealing (allineamento)           | 50°C | 1 min.  |
| ♦ Allungamento                       | 72°C | 90 sec. |
| ♦ Allungamento finale                | 72°C | 7 min.  |

1 µg di DNA, purificato con Kit QIAGEN, è stato inviato per il sequenziamento. Le sequenze ottenute sono state sottoposte ad analisi *in silico* attraverso il programma Blast che confronta le sequenze nucleotidiche con quelle contenute in banca dati del National Center for Biotechnological information (consultabile al sito internet <http://www.ncbi.gov>).

### **2.4.3. Crescita di *Drechslera* spp. in presenza di MtBE e degradazione dell'inquinante**

Il ceppo fungino in esame è stato allevato, partendo da coltura starter, in tubi Falcon contenenti 25 ml di SM1X addizionato di saccarosio all'1% ed MtBE alle concentrazioni di 50 ppm, 100 ppm e 500 ppm. I campioni sono stati incubati in agitazione a 25°C e 150 rpm per un periodo di 7 giorni.

Il livello di crescita del microrganismo fungino è stato valutato misurando la quantità di biomassa liofilizzata prodotta nelle diverse condizioni del saggio a 3, 5 e 7 giorni. Dopo 7 giorni di incubazione, 1 ml di ciascun campione è stato estratto con cloroformio (1:1 v/v) e sottoposto ad analisi GC/FID per determinare la percentuale di degradazione del MtBE.

Il metodo utilizzato per le analisi GC/FID è lo stesso riportato nel paragrafo 2.3.3.

### **2.4.4. Saggi di antagonismo *in vitro* nei confronti di funghi fitopatogeni**

Con questi saggi è stata valutata la capacità antagonista in piastra del ceppo 678 di *Drechslera* spp. nei confronti dei patogeni *R. solani*, *P. ultimum*, *A. alternata* e *B. cinerea*.

Sia il ceppo 678 sia i patogeni sono stati fatti crescere su piastre di PDA alla temperatura di 25°C per 14 giorni. I saggi di biocontrollo sono stati effettuati prelevando dischetti di agar di 5 mm di diametro contenenti il micelio del ceppo 678. Questi sono stati posti su piastre di PDA ed incubati a 25°C. Dopo 4 giorni su ciascuna piastra è stato trasferito anche il patogeno. I saggi sono stati realizzati in duplicato.

La capacità antagonista del ceppo 678 è stata valutata in base all'ampiezza dell'alone di inibizione formatosi in seguito alla crescita dei due microrganismi, come descritto da Whipps, 1987.

#### **2.4.5. Saggi di biocontrollo *in vivo* nei confronti di patogeni terricoli**

Con i saggi effettuati *in vivo* è stata valutata la capacità di biocontrollo di *Drechslera* spp. ceppo 678 nei confronti dei patogeni terricoli *R. solani* e *P. ultimum*.

Semi di pomodoro (*Lycopersicum esculentum* cv. Marmande) sono stati prima sterilizzati con ipoclorito di sodio all'1% per 2 minuti, quindi lavati abbondantemente con acqua distillata sterile. Sia i patogeni sia l'antagonista sono stati allevati per 15 giorni alla temperatura di 25°C in coltura agitata (150 rpm) di PDB.

La biomassa dell'antagonista è stata filtrata con dischi di carta Miracloth sterili e lavata con acqua sterile; è stata quindi uniformemente distribuita nel terreno sterile alla dose di 3 g/Lt di terreno. Dopo 4 giorni, al terreno trattato con l'antagonista, è stata aggiunta la biomassa del patogeno (3 g/Lt di terreno) e i semi precedentemente sterilizzati. L'esperimento è stato condotto in camera di crescita condizionata a 22°C, con una luminosità di 5000 lux e un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

In tutti i saggi sono state previste quattro repliche per ogni trattamento ed un controllo con terreno sterile privo del patogeno. La valutazione della malattia è stata effettuata 7 e 13 giorni dopo la semina valutando il numero dei semi germinati e lo sviluppo radicale delle piantine.

#### **2.4.6. Isolamento e caratterizzazione dei metaboliti secondari prodotti dal ceppo 678 di *Drechslera* spp.**

Dieci dischetti di micelio (diametro di 0.5 cm) di *Drechslera* ceppo 678 sono stati inoculati in beute da 5 L contenenti 2 L di PDB e lasciate in condizioni di staticità per 30 giorni. La coltura è stata filtrata mediante pompa da vuoto attraverso carta Whatman 3MM-CHR (Whatman, Brentford, UK). Il filtrato colturale ottenuto è stato estratto esaustivamente con acetato di etile (EtOAc). Le frazioni organiche raccolte sono state unite e anidificate con l'aggiunta di Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Successivamente il solvente è stato allontanato mediante evaporazione a pressione ridotta.

Il residuo oleaginoso ottenuto dal filtrato colturale è stato analizzato mediante TLC (Si gel, Kieselgel 60, GF254 di 0,25 mm, Merck, Darmstadt; Germany) utilizzando quale sistema eluente EtOAc:etere di petrolio in rapporto 8:2 v/v. I composti sono stati rilevati

con raggi UV (254 o 366 nm) e/o nebulizzando le TLC con  $\text{CeSO}_4$  (10% w/v in acqua) o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (5% v/v in etanolo) e riscaldate a 110° C per 10 minuti.

L'estratto organico è stato successivamente separato mediante cromatografia su colonna a pressione atmosferica (lunghezza 1.30 m; diametro: 4 cm) ed eluito con un gradiente di EtOAc:etere di petrolio da 8:2 v/v a 10:0 v/v. Le frazioni raccolte sono state risolte mediante cromatografia su strato sottile (TLC) analitica (Si gel, Kieselgel 60, GF254 di 0,25 mm, Merck, Darmstadt; Germany), eluite con EtOAc:etere di petrolio in rapporto 8:2 v/v e le frazioni che mostravano lo stesso profilo sono state riunificate.

Alcune frazioni sono state ulteriormente purificate impiegando una TLC preparativa (Si gel, Kieselgel 60, GF254 di 0,5 mm, Merck, Darmstadt; Germany), eluita con una miscela di EtOAc:etere di petrolio 8:2 v/v.

Le cromatografie su colonna sono state effettuate mediante gel di silice Merck, Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm). I solventi ed i reattivi utilizzati sono tutti della Fluka (A.G. Bush, Svizzera) se non altrimenti indicato.

La caratterizzazione dei metaboliti, effettuata presso la University of Western Australia, è stata realizzata mediante gli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ottenuti con uno spettrometro Bruker AM 400 operante a 400 ( $^1\text{H}$ ) e 125 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz utilizzando come standard di riferimento il picco di solventi deuterati e residuali. Gli spettri di massa sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro di massa LC/MS (API 100, PE SCIEX).

#### **2.4.7. Saggi di antibiosi *in vitro* nei confronti di funghi fitopatogeni**

I metaboliti secondari purificati dal ceppo 678 di *Drechslera* spp. sono stati saggiati nei confronti del patogeno terricolo *S. sclerotiorum* e del patogeno fogliare *B. cinerea* al fine di valutare le loro proprietà antibiotiche.

Dischetti di agar di 5 mm di diametro prelevati dal micelio in crescita dei patogeni citati sono stati posti al centro di piastre contenenti PDA 1/5. Sopra ogni dischetto sono stati applicati 10  $\mu\text{l}$  dei metaboliti purificati in un range di concentrazione da 1 a 100  $\mu\text{g}$  per dischetto. Il controllo è stato ottenuto applicando 10  $\mu\text{l}$  di solo sovente.

Come riportato da Almassi *et al.* (1991) il solvente è stato fatto evaporare sotto cappa a flusso laminare e le piastre incubate a 25° C. La crescita del diametro (cm) dei patogeni è stata misurata quotidianamente. Ogni trattamento consiste di tre replicati e l'esperimento è stato ripetuto due volte.

## **2.5. *T. harzianum* ceppo T22**

### **2.5.1. Crescita di *T. harzianum* ceppo T22 in presenza di MtBE e degradazione dell'inquinante**

Il ceppo T22 di *T. harzianum* è stato allevato in presenza di concentrazioni crescenti di MtBE sia partendo da coltura starter sia inoculando 40 µl di una sospensione  $10^8$  sp/ml. Il MtBE è stato addizionato ad una soluzione contenente 25 ml di SM1X e saccarosio all'1% in tubi Falcon in polipropilene. Le concentrazioni di inquinante utilizzate sono state  $0,8 \times 10^{-2}$  M,  $1,6 \times 10^{-2}$  M,  $3,3 \times 10^{-2}$  M,  $6,6 \times 10^{-2}$  M,  $9,3 \times 10^{-2}$  M e  $1,2 \times 10^{-2}$  M.

Per favorire la crescita del micelio fungino, i tubi sono stati incubati in agitatori planetari alla temperatura di 25°C e 150 rpm per 12 giorni.

Il livello di crescita di T22 è stato valutato misurando la quantità di biomassa liofilizzata prodotta nelle diverse condizioni del saggio. Terminato il periodo di incubazione, 1 ml di ciascun campione è stato estratto con cloroformio (1:1 v/v) e sottoposto ad analisi GC/FID.

### **3. RISULTATI**

---

#### **3.1. Ceppi batterici**

##### **3.1.1. Identificazione fenotipica e molecolare di ceppi batterici isolati da siti contaminati da idrocarburi**

I ceppi batterici presenti nei campioni prelevati da siti contaminati da idrocarburi sono stati isolati su PCA e su un substrato contenente il MtBE (unica fonte di nutrienti) e successivamente purificati mediante la tecnica dello striscio su piastra sugli stessi substrati di crescita. Le colture pure sono state osservate al microscopio ottico con lo scopo di riconoscere la morfologia e la struttura cellulare propria di ogni isolato microbico. Le stesse colture sono state sottoposte alla reazione di Gram e al saggio della catalasi. Infine, tutti gli isolati sono stati caratterizzati molecularmente mediante il sequenziamento del 16S rDNA ed identificati confrontando le loro sequenze con quelle conservate in banca dati. I dati relativi all' identificazione fenotipica e molecolare dei ceppi isolati sono riportati in tabella 7.



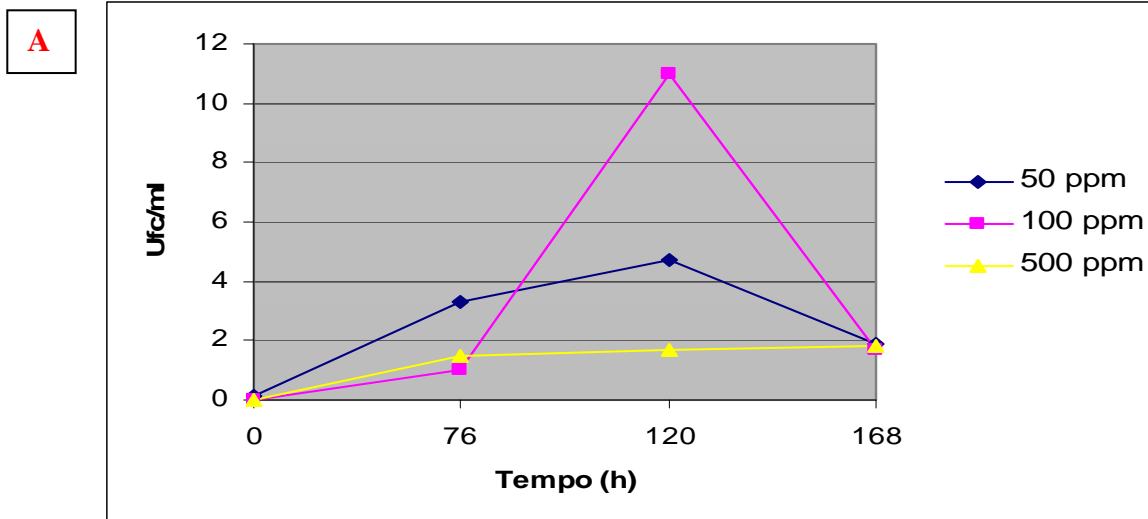
**Tabella 7.** Identificazione fenotipica e molecolare di ceppi batterici isolati da siti contaminati.

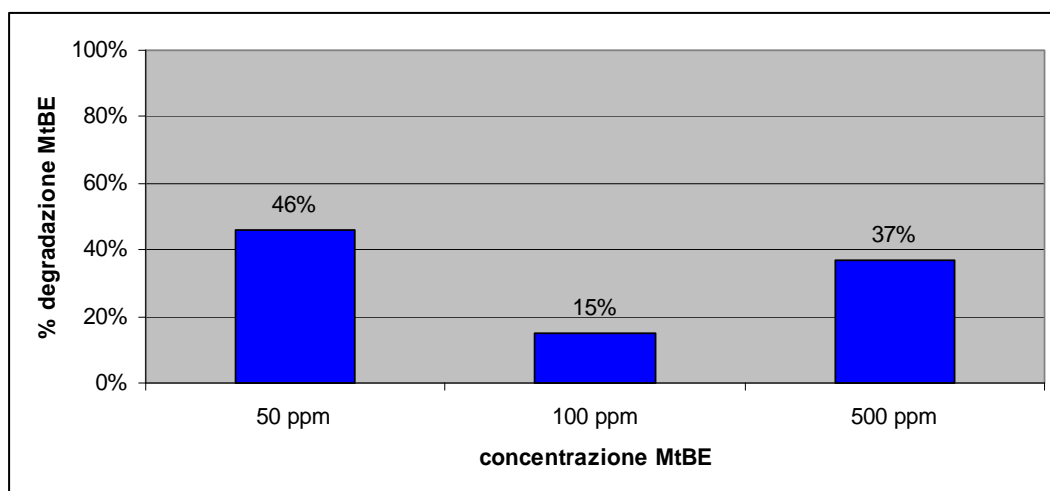
Ceppo	Morfologia in piastra			Morfologia al microscopio	Gram	Catalasi	Identificazione mediante sequenziamento 16S rDNA
	Colore	Margini	Forma				
R1B	Ialine	Irregolari	Estesa, irregolare	Corte e spesse bacchette singole	+	+	<i>Bacillus</i> sp. 99% <i>Bacillus megaterium</i> 99%
R1C1	Bianche	Irregolari	Irregolare a fiore	Corte e sottili bacchette singole	+	+	<i>Bacillus subtilis</i> 99%
R2b	Bianche-trasparenti traslucide	Regolari	Tonde, piccole	Corte e spesse bacchette singole	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp. 95%
R3a	Rosa-arancio	Irregolari	Grandi, irregolari	Cocchi singoli o diplococchi	+	+	<i>Kocuria</i> sp. 97%
R4a	Bianche	Irregolari	Irregolare	Spesse bacchette coppia o catenella+spore	+	+	<i>Bacillus</i> sp. 98%
R7b1	Bianche	Irregolari	Estesa, irregolare	Coccobacilli	+	+	<i>Unidentified bacterium</i> 99% <i>Bacterium</i> W02 99%
R7C	Bianche	Irregolari	Estesa, irregolare	Grandi bacchette a coppia+spore	+	+	<i>Bacillus cereus</i> 99% <i>Bacillaceae bacterium</i> 99% <i>Glacial ice bacterium</i> 99%
R7e2C2	Gialle	Regolari	Tonde, grandi	Corte e spesse bacchette a coppia	+	+	<i>Bacillus</i> sp. 98% <i>Bacillus aquimaris</i> 97%
R7e2C11	Bianche	Regolari	Tonde, piccole	Cocchi singole o coppia	+	+	<i>Janibacter melonis</i> 97% <i>Janibacter marinus</i> 97%
R7e2d	Giallo-arancioni	Irregolari	Tonde, grandi	Lunghe e spesse bacchette a coppia	+	+	<i>Bacillus</i> sp. 96%
R8b	Bianche-gialle traslucide	Regolari	Tonde, grandi	Corte e spesse bacchette singole o coppia	-	-	<i>Thiobacillus</i> sp. S1 96% <i>Rhizobium</i> sp. 96% - <i>Ancylobacter</i> sp. 96%
R8e	Bianca-translucida mucillaginose	Irregolari	Estesa, irregolare	Corte e sottili piccolissime bacchette singole o coppia	+	+	<i>Bosea enae</i> 99% <i>Bosea thiooxidans</i> 99%
R8i	Bianche-trasparenti traslucide	Regolari	Tonde, piccole	Sottili piccole bacchette singole o coppia	+	+	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> 96%
R8fa	Bianche	Regolari	Tonde, piccole	Bacchette lunghe e spesse a virgola	+	+	<i>Uncultured eubacterium</i> 98% <i>Rhodovarius lipocyclicus</i> 98%
O 3a	Bianche	Irregolari	Estesa, irregolare	Corte e spesse bacchette singole	+	+/-	<i>Bacillus</i> sp. 98%

### 3.1.2. Crescita di ceppi batterici in presenza di MtBE e degradazione dell'inquinante

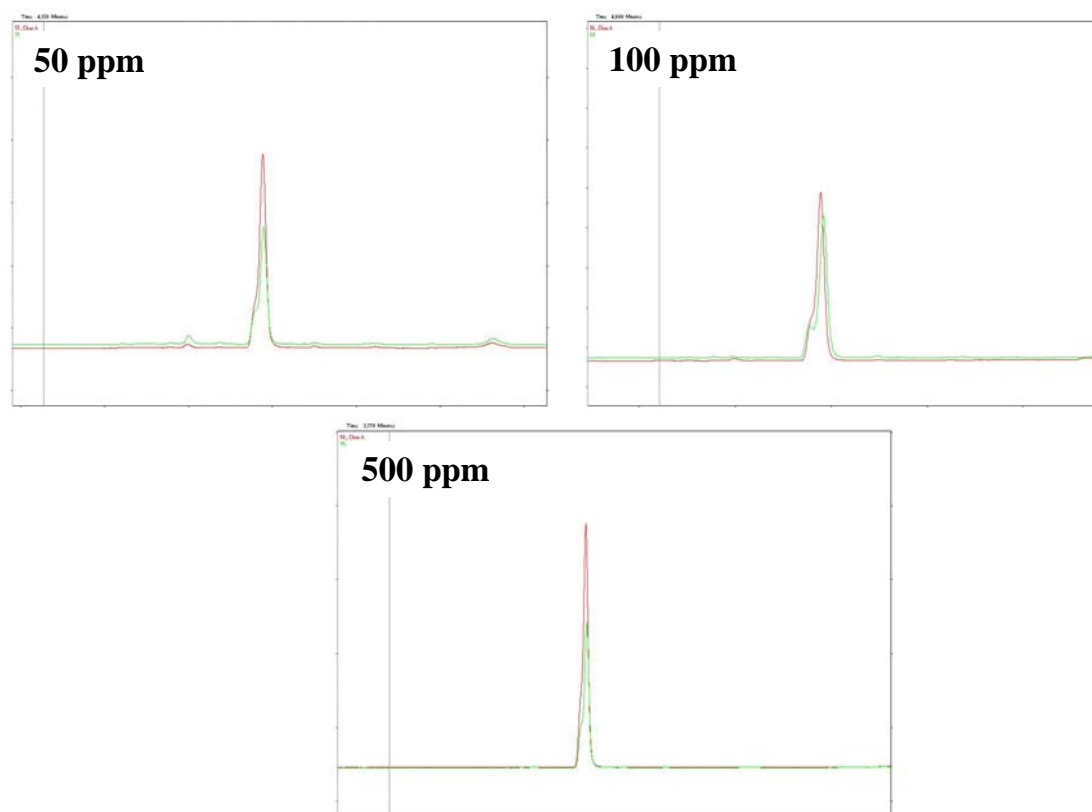
Tutti gli isolati batterici sono stati inoculati in un mezzo minimo di sali ed oligoelementi (FTW) addizionato con 50 ppm di MtBE. I campioni sono stati estratti con cloroformio e sottoposti ad analisi gascromatografica (GC/FID). La valutazione dei dati di degradazione ha consentito di selezionare 3 ceppi batterici: *Bacillus* sp. -ceppo R1B-, *Thiobacillus* sp. -ceppo R8b- e *Mycobacterium mucogenicum* -ceppo R8i. Successivamente, i ceppi selezionati sono stati nuovamente inoculati in FTW in presenza di concentrazioni crescenti dell'inquinante (50 ppm, 100 ppm e 500 ppm).

Il ceppo R1B ha evidenziato una crescita stentata in presenza del contaminante rilevabile in termini di unità formanti colonie (UFC). Tale isolato batterico è comunque stato in grado di degradare il MtBE del 46, 15 e 37% (figura 9) alle concentrazioni di 50, 100 e 500 ppm, rispettivamente come mostrato dalle analisi GC/FID a cui sono stati sottoposti i campioni (figura 10).



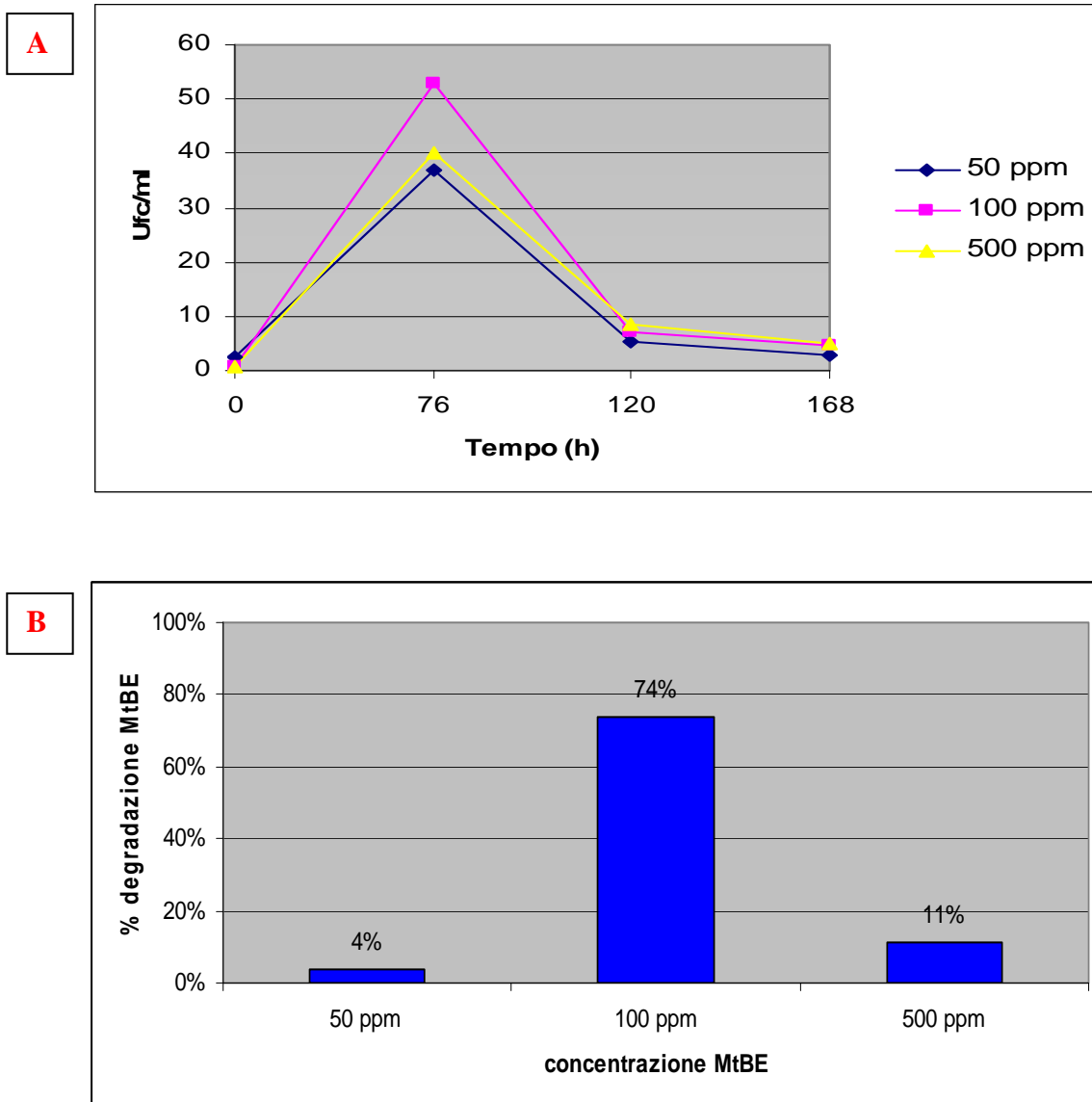
**B**

**Figura 9.** Crescita del ceppo R1B in presenza di diverse concentrazioni di MtBE (A) e percentuali di degradazione dell'inquinante (B).

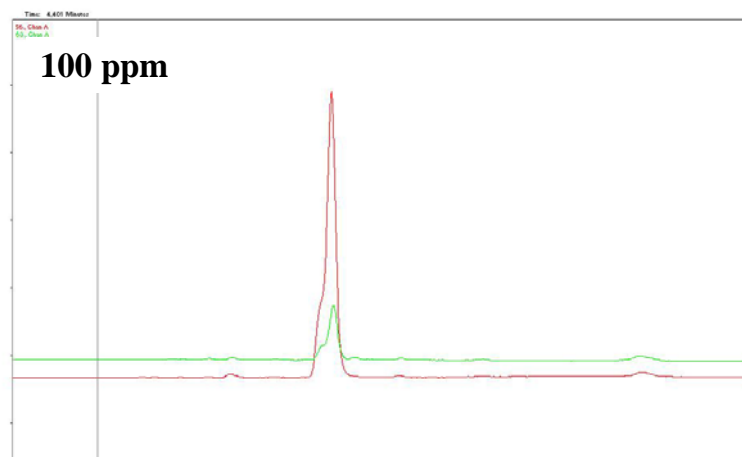


**Figura 10.** Analisi GC/FID dell'estratto in  $\text{CHCl}_3$  a diverse concentrazioni ad opera del ceppo batterico R1B (area circoscritta dalla linea rossa = controllo non trattato; area circoscritta dalla linea verde = controllo trattato con R1B). Tempo di ritenzione del MtBE nelle condizioni del saggio: 4,300 minuti.

Il ceppo R8i è stato in grado di tollerare il MtBE riuscendo a degradarlo del 74% quando questo era presente ad una concentrazione pari a 100 ppm (figura 11 e 12).

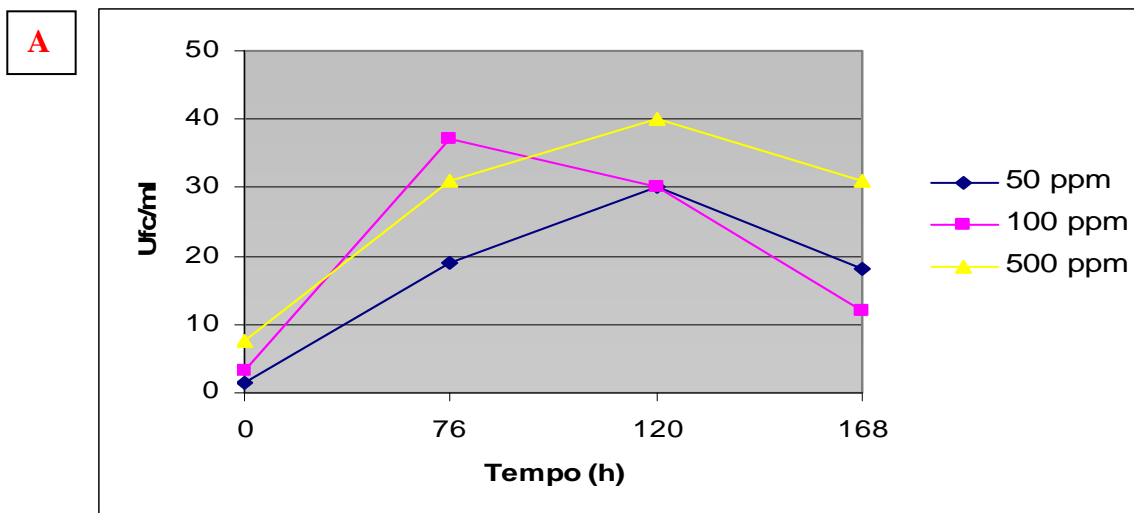


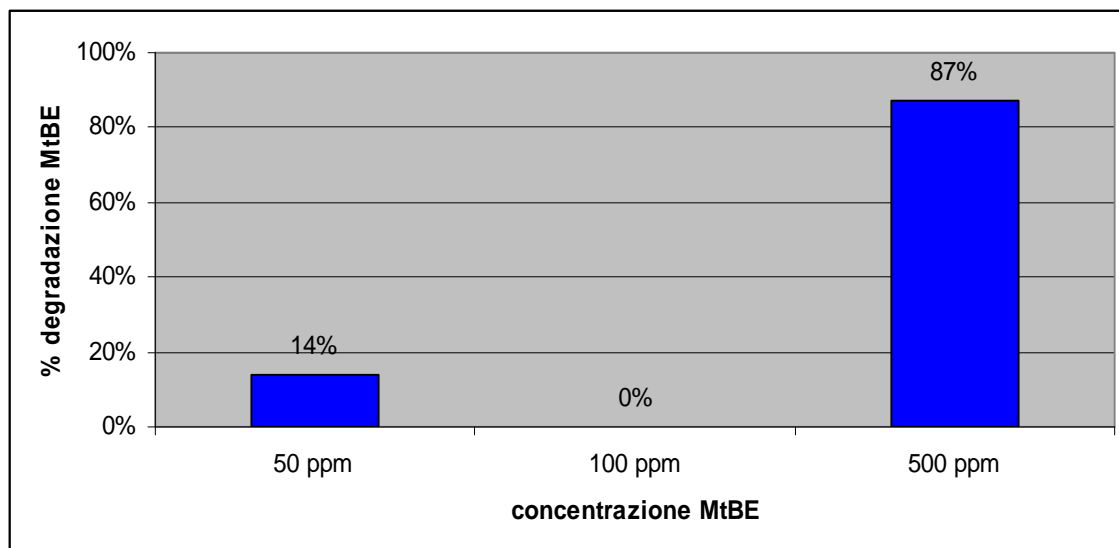
**Figura 11.** Crescita del ceppo R8i in presenza di diverse concentrazioni di MtBE (A) e percentuali di degradazione dell'inquinante (B).



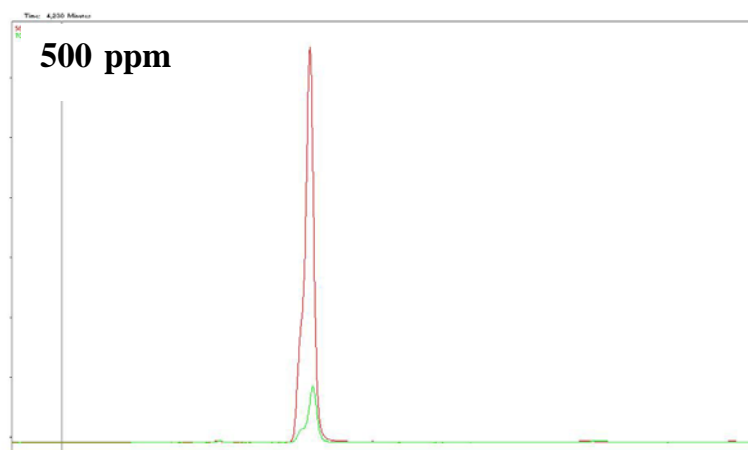
**Figura 12.** Analisi GC/FID dell'estratto in  $\text{CHCl}_3$  alla concentrazione di 100 ppm ad opera del ceppo batterico R8i (area circoscritta dalla linea rossa = controllo non trattato; area circoscritta dalla linea verde = controllo trattato con R8i). Tempo di ritenzione del MtBE nelle condizioni del saggio: 4,300 minuti.

Infine, il ceppo R8b ha mostrato la migliore capacità di degradazione dell'inquinante (87%) quando era presente alla concentrazione di 500 ppm (figura 13 e 14).



**B**

**Figura 13.** Crescita del ceppo R8b in presenza di diverse concentrazioni di MtBE (A) e percentuali di degradazione dell'inquinante (B).



**Figura 14.** Analisi GC/FID dell'estratto in  $\text{CHCl}_3$  alla concentrazione di 500 ppm ad opera del ceppo batterico R8b (area circoscritta dalla linea rossa = controllo non trattato; area circoscritta dalla linea verde = controllo trattato con R8b). Tempo di ritenzione del MtBE nelle condizioni del saggio: 4,300 minuti.

### 3.1.3. Saggi di antagonismo *in vitro* nei confronti di funghi fitopatogeni

Sono stati allestiti saggi *in vitro* al fine di verificare l'attività di biocontrollo dei ceppi batterici selezionati (R1B, R8b e R8i) nei confronti dei patogeni fogliari *B. cinerea* e *A. alternata* e del patogeno terricolo *P. ultimum*.

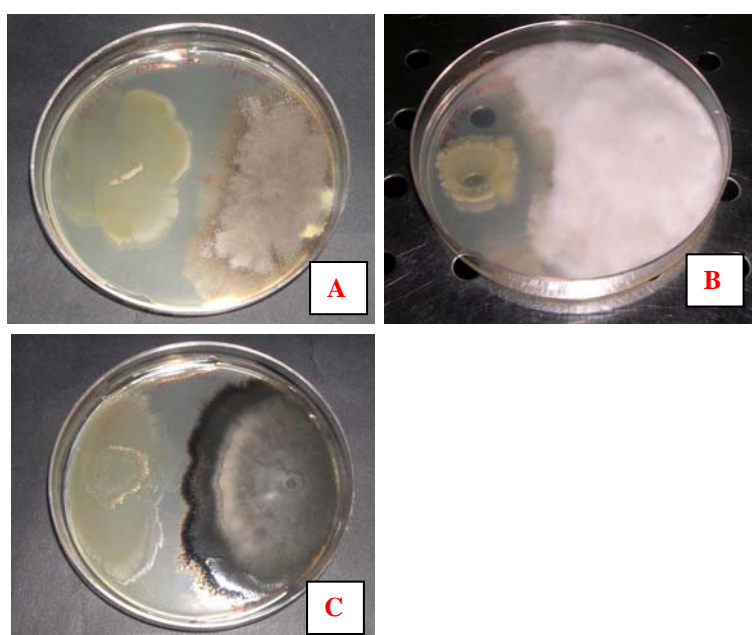
I saggi sono stati condotti inoculando al margine della piastra di PDA 50 µl della sospensione batterica. Le piastre sono state incubate per 24h a 28°C. Al termine di questo periodo, sulla stessa piastra Petri, sono stati inoculati dei dischetti di agar di 0.5 cm di diametro prelevati al margine delle colonie fungine allevate su PDA. La capacità antagonista è stata valutata in base all'ampiezza dell'alone di inibizione formatasi in seguito alla crescita dei due microrganismi.

Dai risultati ottenuti il ceppo R8b è apparso il miglior agente antagonista riuscendo ad inibire *B. cinerea*, *P. ultimum* e *A. alternata* rispettivamente del 50, 39 e 24% (figura 15).

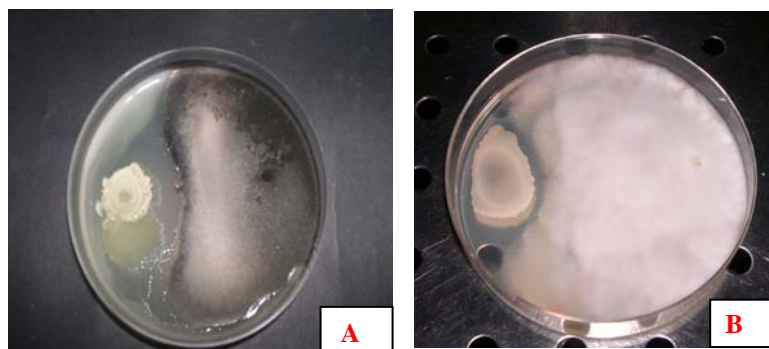
Il ceppo R1B, invece, è stato in grado di inibire la crescita di *A. alternata* e *P. ultimum* rispettivamente del 32 e 25 % (figura 16).

Infine, il ceppo R8i non ha inibito in maniera significativa nessuno dei patogeni saggiati.

Non è stato osservato nessun effetto di inibizione nei confronti di *R. solani*.



**Figura 15.** Saggi di antagonismo *in vitro* del ceppo R8b nei confronti del patogeno *B. cinerea* (A); *P. ultimum* (B) e *A. alternata* (C).



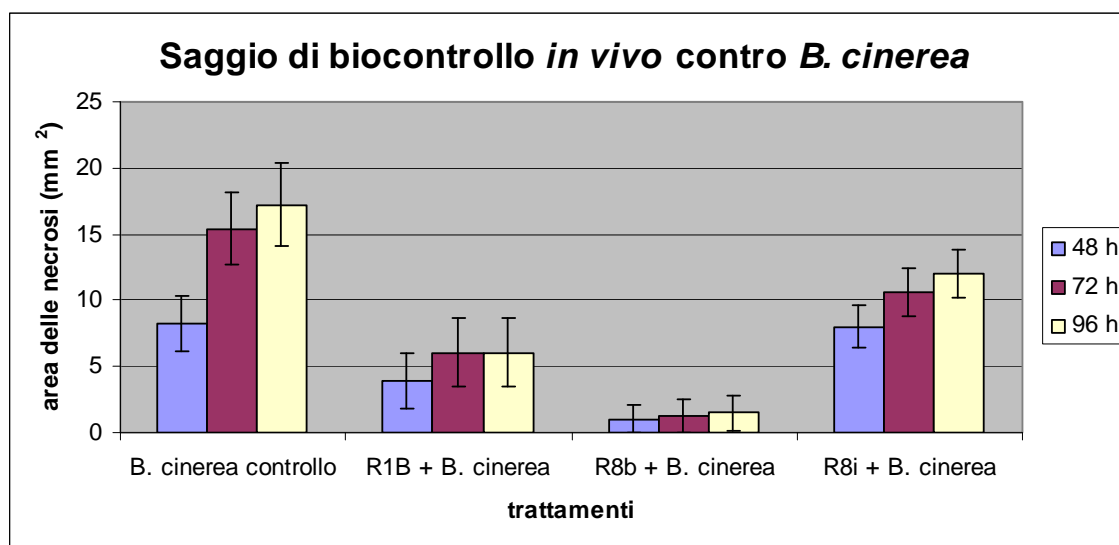
**Figura 16.** Saggi di antagonismo *in vitro* del ceppo R1B nei confronti del patogeno *A. alternata* (A) e *P. ultimum* (B).

#### **3.1.4. Saggi di biocontrollo *in vivo* nei confronti dei patogeni fogliari *B. cinerea* e *A. alternata***

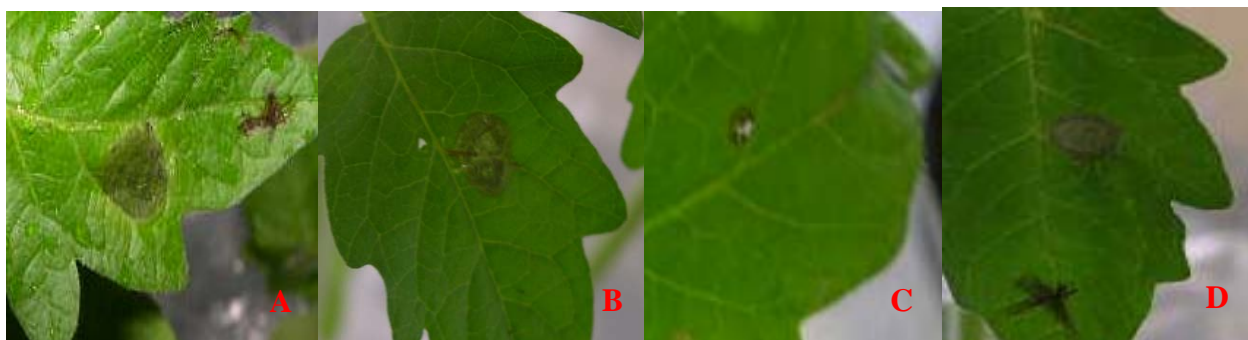
L'azione di biocontrollo esercitata dai 3 ceppi batterici selezionati è stata valutata nei confronti dei patogeni fogliari *B. cinerea* e *A. alternata* in termini di riduzione dell'estensione delle aree necrotiche dovute all'avanzamento del patogeno nei tessuti vegetali a distanza di 48, 72 e 96 ore dall'inoculo dello stesso.

I risultati, riportati in figura 17 e 18, evidenziano un significativo contenimento nell'espansione delle aree necrotiche prodotto in seguito all'inoculo di *B. cinerea*. Tutti i ceppi batterici selezionati sono stati in grado di controllare il patogeno. Le lesioni prodotte sulle foglie trattate con la sospensione batterica dei ceppi R8b ed R1B sono risultate meno estese già 48 ore dopo l'inoculo del patogeno. L'efficacia del ceppo R8i è apparsa significativa solo a partire dalle 72 ore successive all'inoculo.



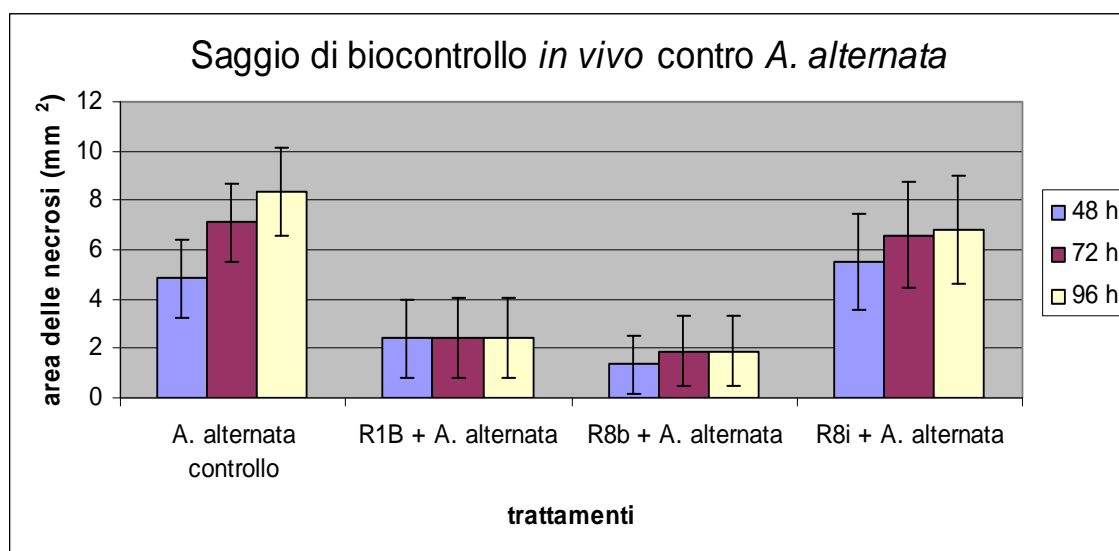


**Figura 17.** Dimensioni delle aree necrotiche causate da *B. cinerea* su foglie di pomodoro trattate con una sospensione dei ceppi batterici selezionati.



**Figura 18.** Saggi di biocontrollo *in vivo* nei confronti del patogeno *B. cinerea*. (A) *B. cinerea* controllo, (B) trattamento con R1B e *B. cinerea*, (C) trattamento con R8b e *B. cinerea*, (D) trattamento con R8i e *B. cinerea*.

Lo stesso saggio è stato effettuato nei confronti di *A. alternata*. Anche in questo caso, i ceppi R8b ed R1B hanno mostrato la capacità di controllare l'avanzamento del patogeno. Il ceppo R8i non ha ridotto significativamente le lesioni causate da *A. alternata* (figura 19 e 20).



**Figura 19.** Dimensioni delle aree necrotiche causate da *A. alternata* su foglie di pomodoro trattate con una sospensione dei ceppi batterici selezionati.



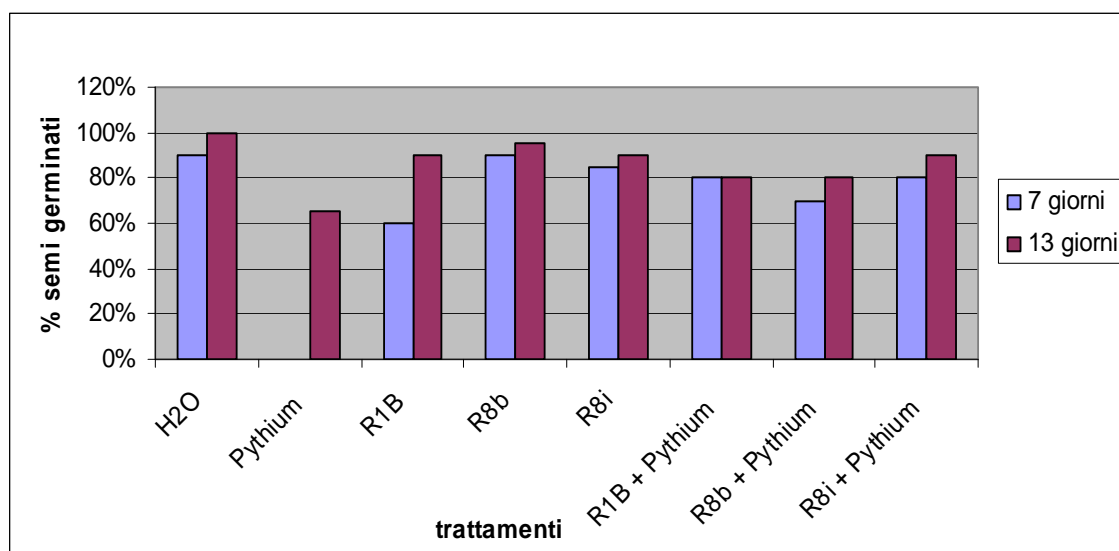
**Figura 20.** Saggi di biocontrollo *in vivo* nei confronti del patogeno *A. alternata*. (A) *A. alternata* controllo, (B) trattamento con R1B e *A. alternata*, (C) trattamento con R8b e *A. alternata*, (D) trattamento con R8i e *A. alternata*.

### 3.1.5. Saggi di biocontrollo *in vivo* nei confronti del patogeno terricolo *P. ultimum*

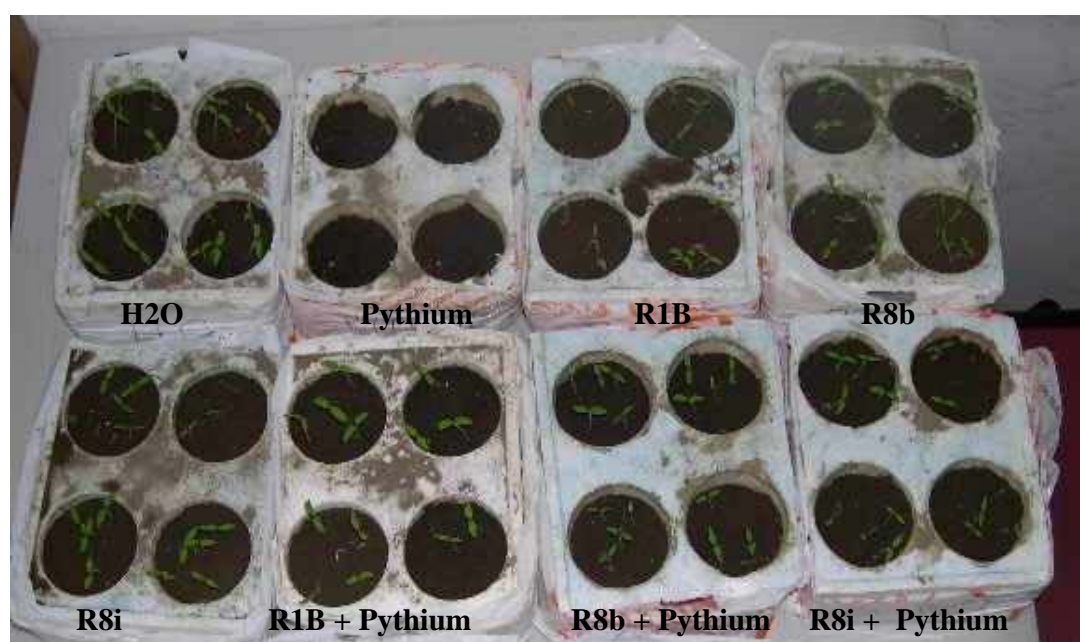
Al fine di valutare l'attività di biocontrollo nei confronti di *P. ultimum*, semi di pomodoro cv. Marmande sono stati trattati con una sospensione di ciascun ceppo batterico e messi a dimora in terreno precedentemente trattato con il patogeno. La

valutazione della malattia è stata effettuata a 7 e 13 giorni dalla semina stimando il numero dei semi germinati.

Dai risultati ottenuti è possibile notare come l'azione di tutti e tre i ceppi batterici ha ridotto gli effetti negativi dovuti alla presenza del patogeno favorendo notevolmente la germinazione dei semi trattati rispetto a quelli non trattati (figura 21). Questi risultati appaiono evidenti e confermati anche dalle immagini riportate in figura 22.

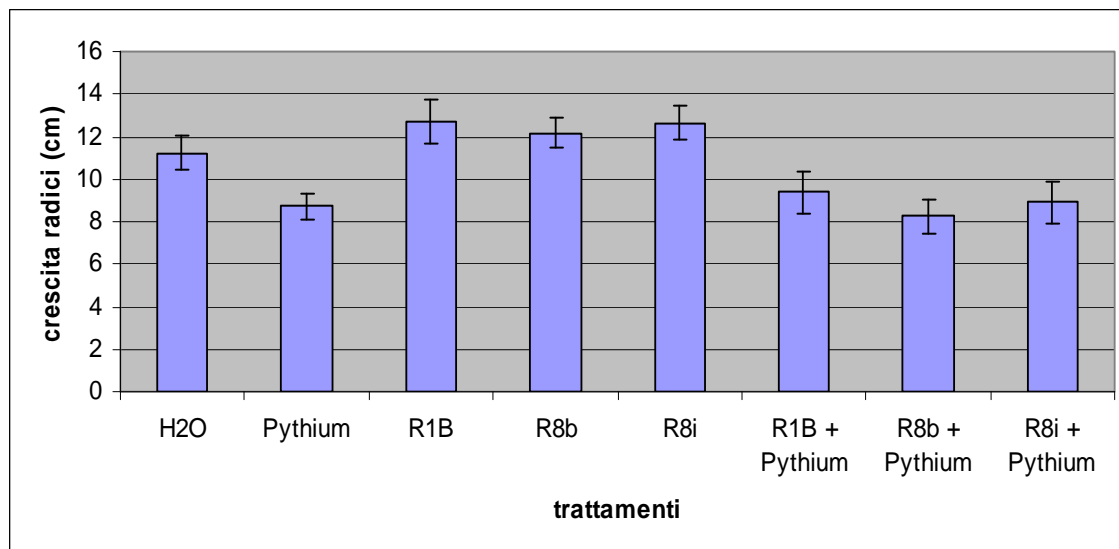


**Figura 21.** Percentuale dei semi di pomodoro germinati 7 e 13 giorni dopo l'inizio del saggio.



**Figura 22.** Saggi di biocontrollo *in vivo* nei confronti del patogeno *P. ultimum*.

In assenza del patogeno, le piante i cui semi sono stati trattati con i batteri hanno mostrato un maggior sviluppo radicale rispetto al controllo. In terreno infetto, invece, i ceppi batterici non sono riusciti a contrastare in maniera efficace l'effetto di *P. ultimum* (figura 23).



**Figura 23.** Crescita delle radici di piante di pomodoro in presenza del patogeno *P. ultimum* e dei ceppi batterici selezionati.

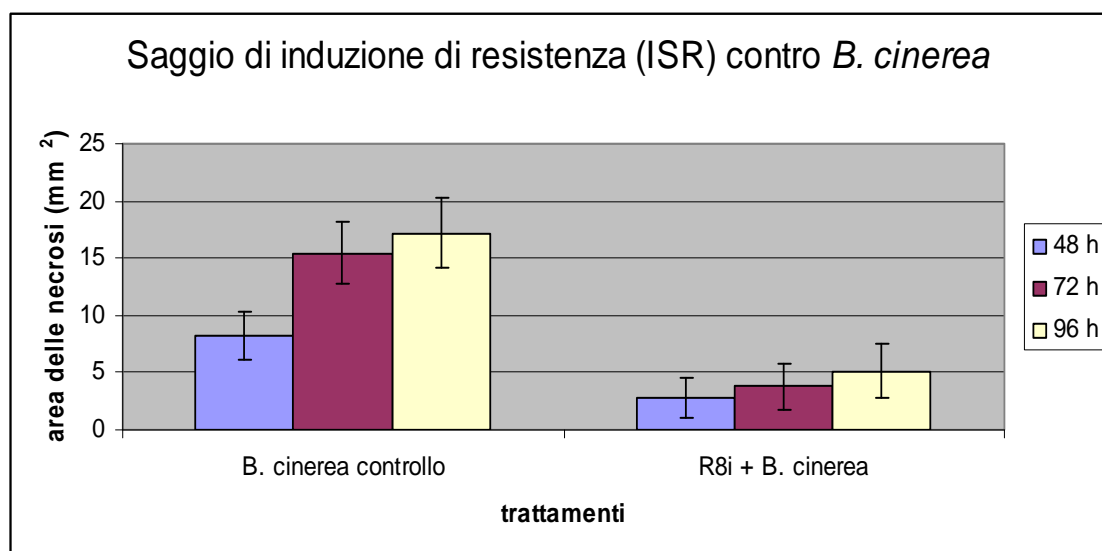
### 3.1.6. Saggi di Induzione di Resistenza (ISR)

Al fine di verificare la capacità dei ceppi batterici selezionati di indurre resistenza sistemica (Induced Systemic Resistance - ISR) nella pianta ospite sono stati allestiti saggi *in vivo* nei confronti del patogeno fogliare *B. cinerea*.

Sono stati fatti germinare semi di pomodoro cv. Marmande in terreno sterile e, sulle foglie vere del palco inferiore sono stati spruzzati 3 ml della sospensione di batteri concentrata  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Successivamente, le foglie del palco superiore sono state inoculate con 10  $\mu$ l di una sospensione conidica di *B. cinerea* ( $1 \times 10^6$  spore/ml).

Per la valutazione dei saggi sono state misurate le aree necrotiche (esprese in  $\text{mm}^2$ ) apparse sulle foglie 48, 72 e 96 ore dopo l'inoculo del patogeno.

Di tutti e 3 i ceppi batterici selezionati solo il ceppo R8i è stato in grado di indurre resistenza in pianta contenendo l'espansione delle aree necrotiche provocate dal patogeno già 48 ore dopo l'inoculo (figura 24 e 25).



**Figura 24.** Dimensioni delle aree necrotiche causate da *B. cinerea* su foglie di pomodoro trattate con una sospensione del ceppo batterico R8i.

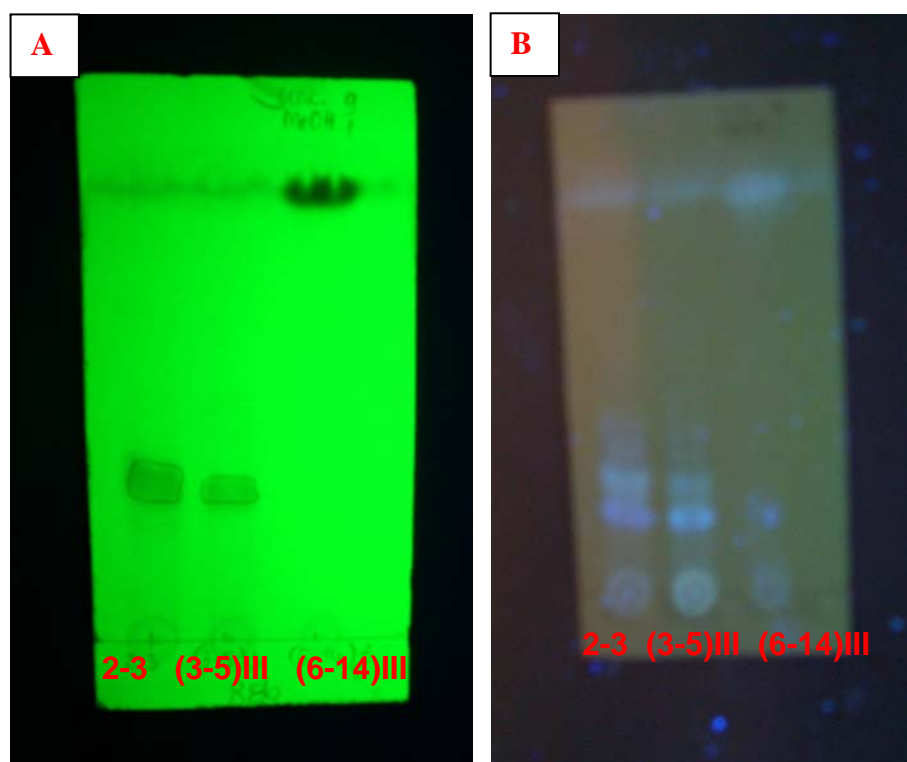


**Figura 25.** Saggio di Induzione di Resistenza nei confronti del patogeno *B. cinerea*. (A) *B. cinerea* controllo, (B) trattamento con R8i e *B. cinerea*.

### 3.1.7. Isolamento e caratterizzazione dei metaboliti secondari prodotti dai ceppi batterici selezionati

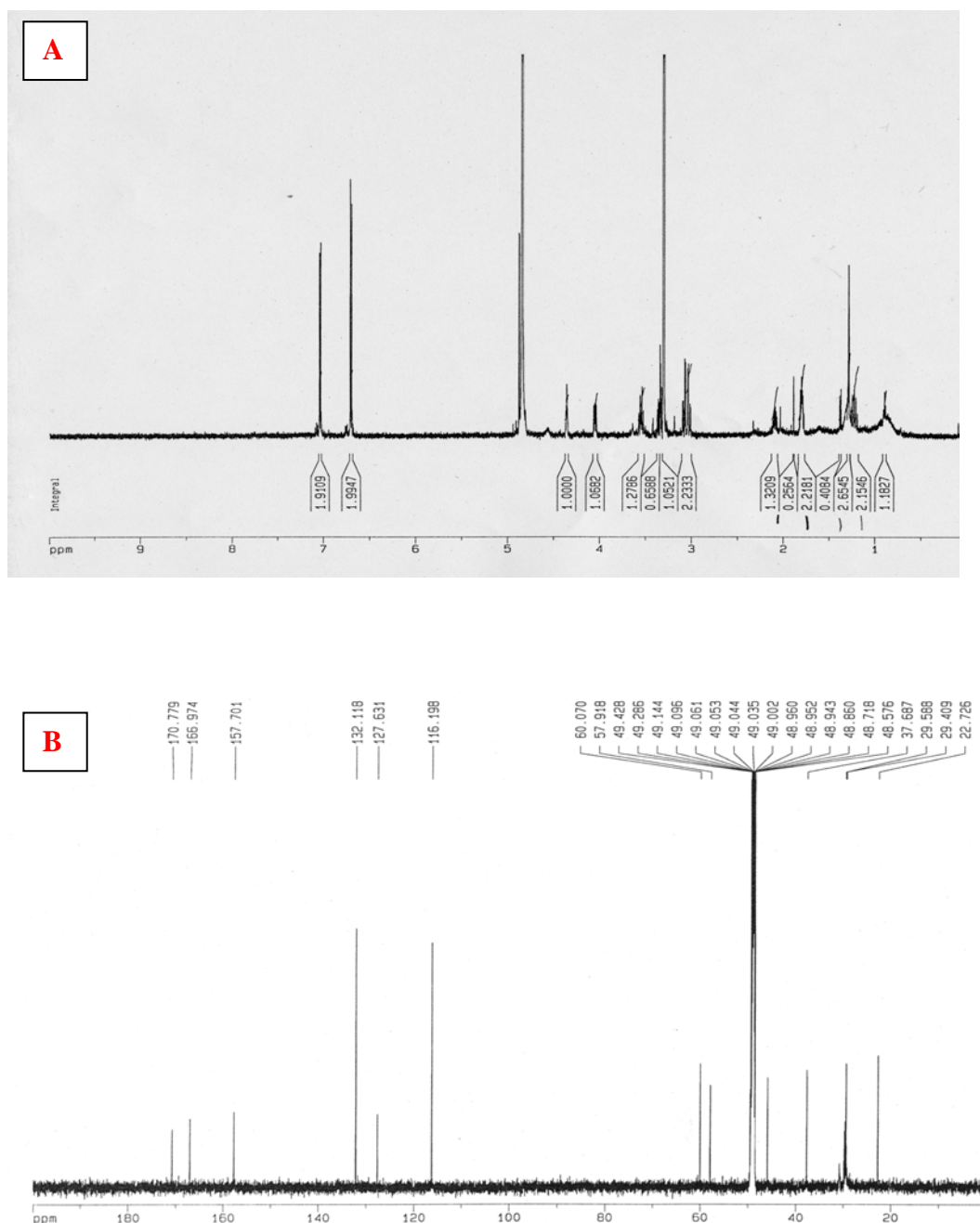
I filtrati colturali dei 3 ceppi batterici selezionati sono stati estratti con la procedura riportata in materiali e metodi e sottoposti a cromatografia su colonna a pressione atmosferica. I residui oleaginosi dei ceppi R1B e R8i, rispettivamente pari a 234,2 mg e 253 mg sono risultati costituiti prevalentemente da acidi grassi e lipocarboidrati.

I risultati più interessanti riguardano il ceppo R8b. Dal residuo oleaginoso (265,6 mg) ottenuto da questo isolato batterico sono state raccolte quattordici frazioni omogenee e quelle con lo stesso profilo cromatografico sono state riunite ed ulteriormente purificate mediante TLC preparativa. In particolare, dalle frazioni (2-3), (3-5)III e (6-14)III è stato purificato il principale metabolita secondario prodotto dal ceppo R8b (figura 26).



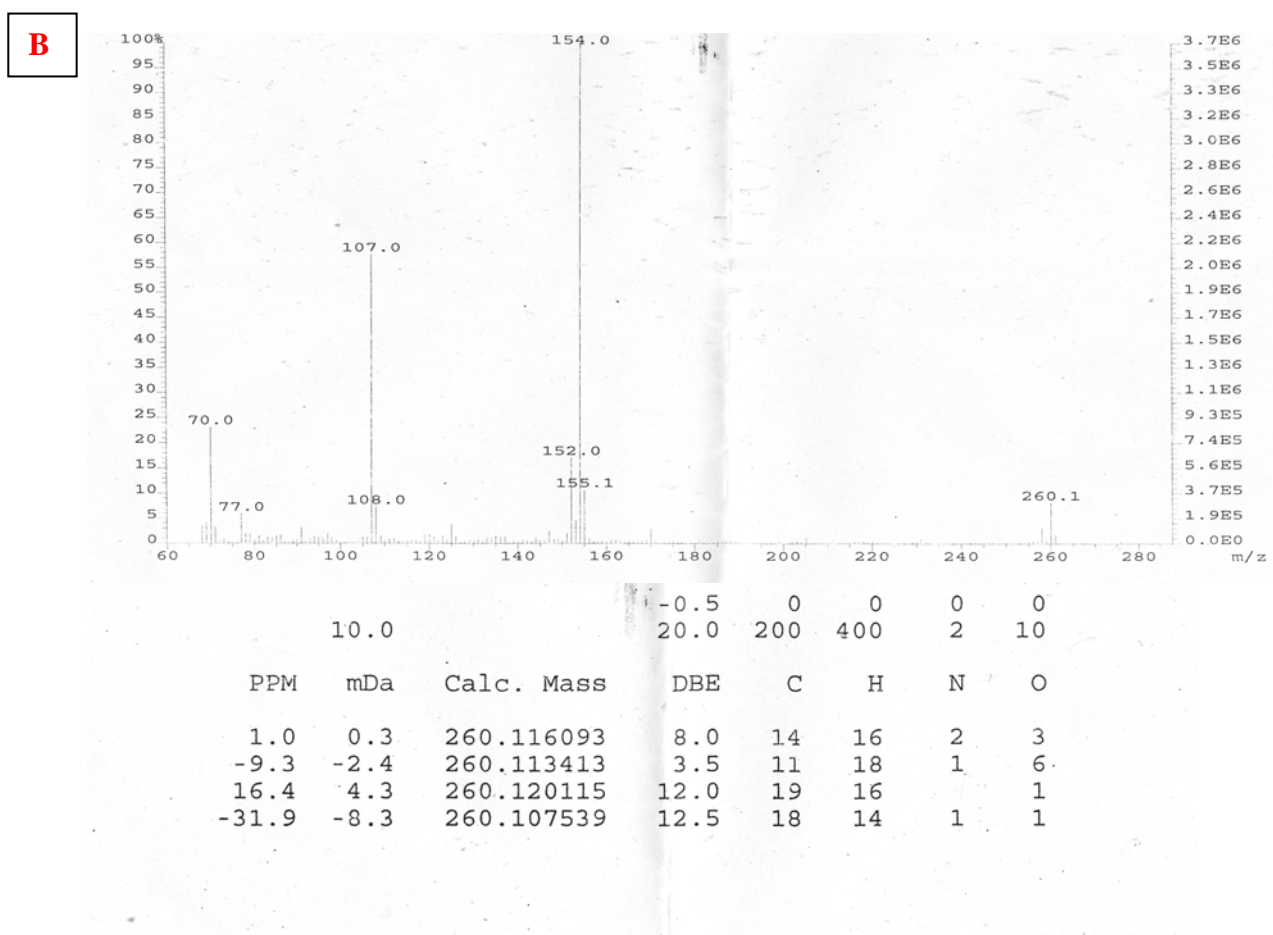
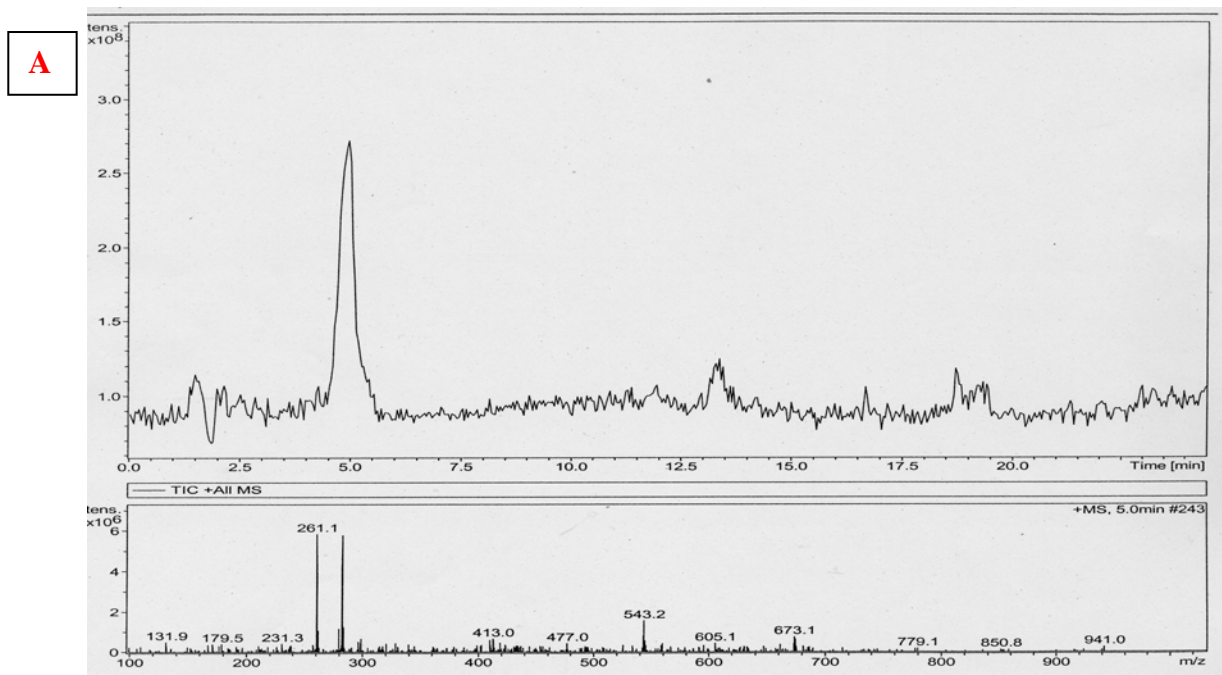
**Figura 26.** TLC analitica delle frazioni (2-3)/(3-5)III/(6-14)III mediante esposizione a lampada UV a 254 (A) e 366 nm (B).

L'analisi degli spettri NMR (Figura 27) e degli spettri di massa (LC/MS e HRMS Ei mode - Figura 28 A e B) ha evidenziato che la molecola in esame possiede gli stessi segnali caratteristici della maculosina (Chen e Murakami, 1971; Stierle *et al.*, 1988, Cain *et al.*, 2003) (Figura 29).



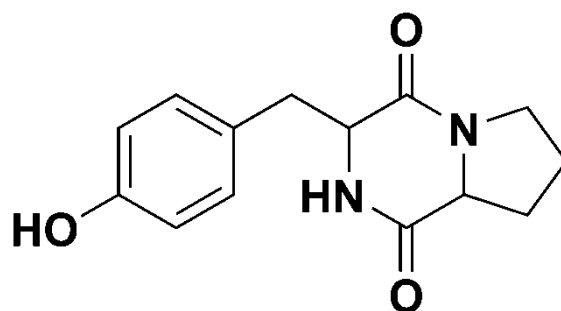
**Figura 27.** Spettri  $^1\text{H}$  (A) e  $^{13}\text{C}$  (B) NMR del metabolita secondario isolato dal ceppo R8b.





**Figura 28.** A) LC/MS della maculosina; B) HRMS del metabolita secondario isolato dal ceppo R8b.





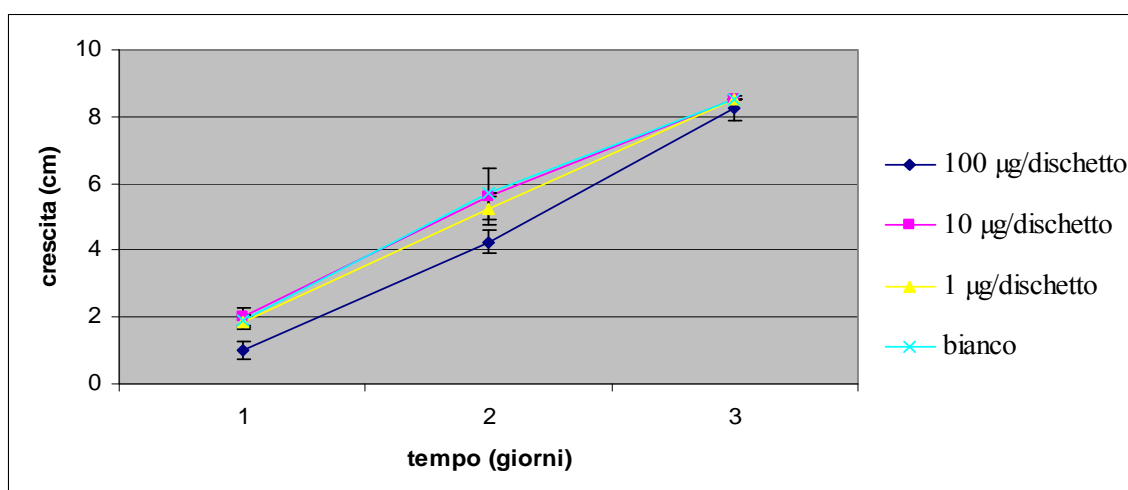
**Figura 29.** Maculosina.

### 3.1.8. Saggi di antibiosi *in vitro* nei confronti di funghi fitopatogeni

L'attività antibiotica della maculosina è stata saggiata nei confronti degli agenti fitopatogeni *R. solani* (Basidiomicete), *B. cinerea* (Ascomicete), *P. ultimum* (Oomicete) e *A. alternata* (Deuteromicete) al fine di verificarne le proprietà antimicrobiche.

Il metabolita in questione è stato applicato su dischetti di agar prelevati dal micelio in crescita dei patogeni a tre diverse concentrazioni, ovvero 1, 10 e 100 µg per dischetto. I risultati ottenuti, valutati in termini di riduzione della crescita radiale dei funghi fitopatogeni, hanno evidenziato un'apparente specificità nell'attività di antibiosi.

La maculosina ha mostrato modesta capacità di inibizione nei confronti di *R. solani* (Figura 30). Non è stata osservata alcuna attività antibiotica nei confronti degli altri patogeni testati (dati non mostrati).



**Figura 30.** Effetto della maculosina sulla crescita di *R. solani*. Bianco = controllo; ◆ = 100 µg del metabolita per dischetto; ■ = 10 µg del metabolita per dischetto; ▲ = 1 µg del metabolita per dischetto.

### **3.2. *Drechslera* spp. ceppo 678**

#### **3.2.1. Caratterizzazione di *Drechslera* spp. ceppo 678**

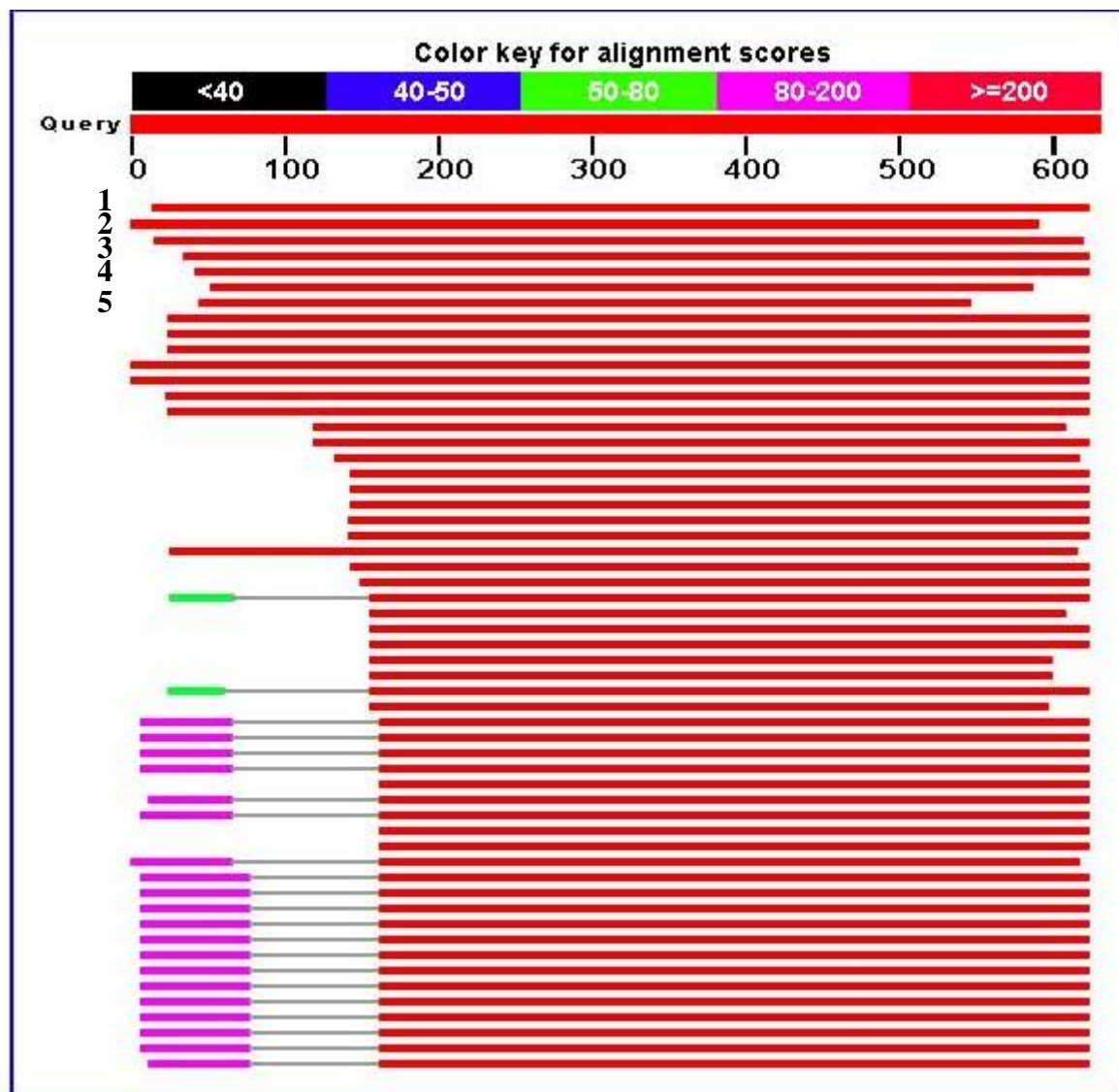
La sequenza nucleotidica del ceppo 678, ottenuta in seguito al sequenziamento della regione ITS amplificata, è indicata in figura 31.

```
TAAGTAGAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCA
TTACACAATATGCAAGCGGGCTGGGATCCCCGGGAGGGCGTCTATTCTGCT
GTTTCCGCCGCATCTGCGGTGCTGAAGCGACAGGGCGGGCGTCTTTTCGGCC
AGCCTGACTCCATATTCACCCATGTCTTTTGCGTACTACTTGTTTCCTTGGTG
GGTTCGCCCACCAACAGGACCATTTAAACCTTTTTGTAAATTGCAATCAGCGT
CAGCAAAACAATGTAATAAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGTTCT
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCA
AAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTT
GGGCGTTTTTGTCTCTGGTCCGCCAGCGACTCGCCTTAAAATCATTGGCAGC
CGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAATTTGCGCTTCTTCCAGCAGCGG
TCCGCGTCCATGAAGCCACTTTTCAACGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATA
CCCCCGCAAAA
```

**Figura 31.** Sequenza nucleotidica del ceppo 678.

L'analisi in banca dati utilizzando il sistema Blast (figura 32) a cui è stata sottoposta la sequenza ottenuta, ci ha permesso di identificare con certezza il ceppo 678 come appartenente al genere *Drechslera* spp.

In figura 33 è possibile osservare che il livello di omologia del ceppo 678 nei confronti di *Drechslera* spp. è pari al 99%.



**Figura 32.** Analisi Blast della sequenza nucleotidica ottenuta dal ceppo 678.

1	<b>FJ868975.1</b>	Drechslera sp. BAFC 3419 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal gene, and internal transcribed spacer complete sequence; and 28S ribosomal gene, partial sequence
2	<b>AJ246156.1</b>	wheat root associated euascomycete 00' 5S rRNA and partial 18S rRNA genes and ITS1 and 2, isolate 00W8
3	<b>AY336133.1</b>	Drechslera sp. B401 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal gene, and internal transcribed spacer complete sequence; and 18S ribosomal gene, partial sequence
4	<b>AB199583.1</b>	Aff. Drechslera MT0008 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA partial sequence
5	<b>AF504832.1</b>	Uncultured fungus clone D50 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal gene and internal transcribed spacer complete sequence; and 28S ribosomal gene, partial sequence

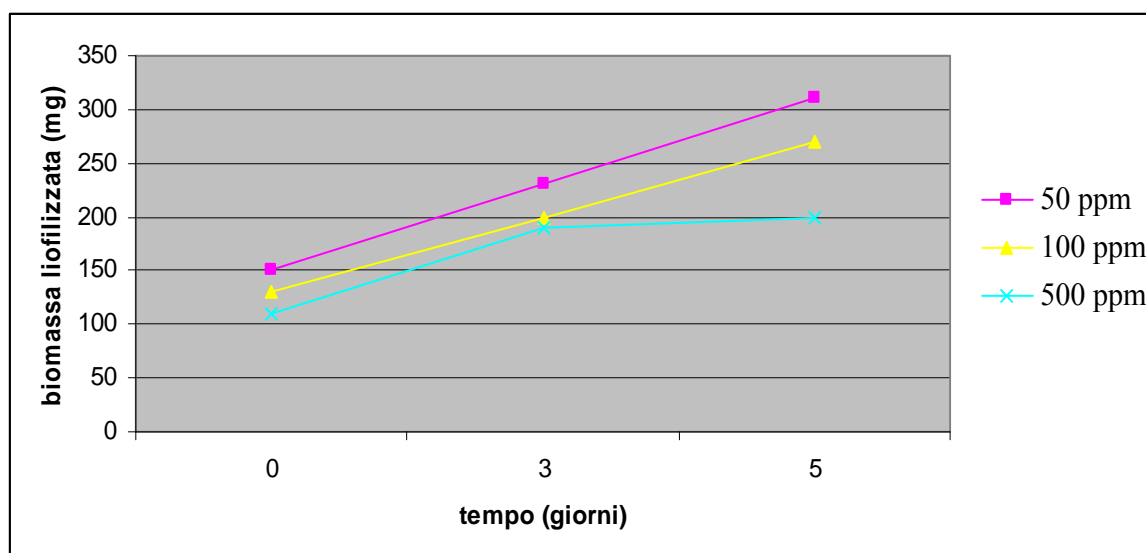
**Figura 33.** Livelli di omologia del ceppo 678.

### **3.2.2. Crescita di *Drechslera* spp. in presenza di MtBE e degradazione dell'inquinante**

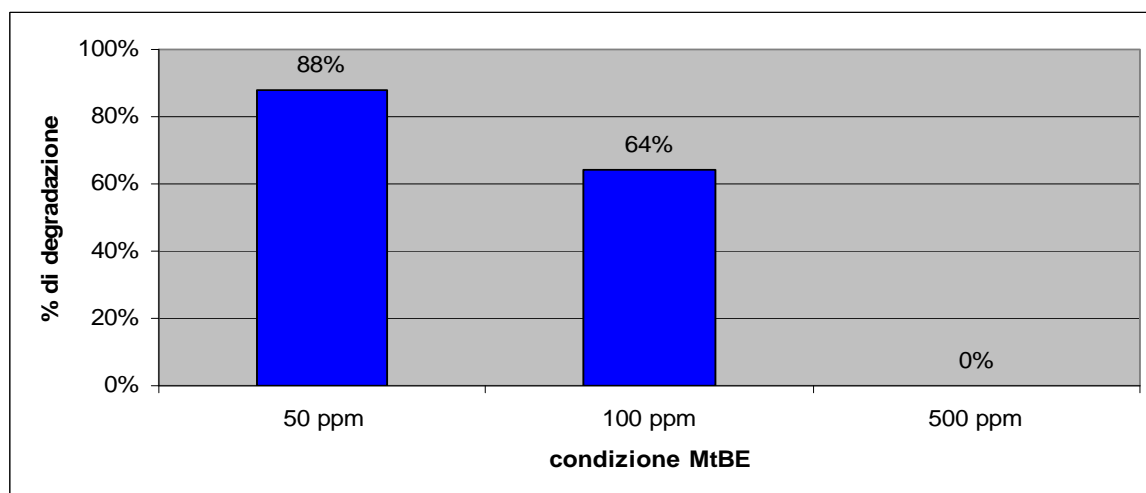
Il ceppo 678 di *Drechslera* spp. è stato accresciuto in un mezzo minimo (SM) addizionato di saccarosio all'1% ed MtBE alle concentrazioni di 50, 100 e 500 ppm. Il livello di crescita del microrganismo fungino è stato valutato misurando la quantità di biomassa prodotta mentre la capacità degradativa è stata misurata mediante analisi GC/FID.

Il ceppo 678 è stato in grado di crescere a tutte le concentrazioni di MtBE saggiate (figura 34). Le analisi GC/FID hanno evidenziato la capacità del microrganismo fungino di riuscire a degradare la sostanza inquinante dell'88 e del 64% quando questa è presente, rispettivamente, alla concentrazione di 50 e 100 ppm come mostrato in figura 35.

Non è stata osservata alcuna degradazione del MtBE alla concentrazione di 500 ppm.



**Figura 34.** Biomassa liofilizzata prodotta dal ceppo 678 in presenza di concentrazioni crescenti di MtBE.



**Figura 35.** Percentuali di degradazione del MtBE ad opera del ceppo 678.

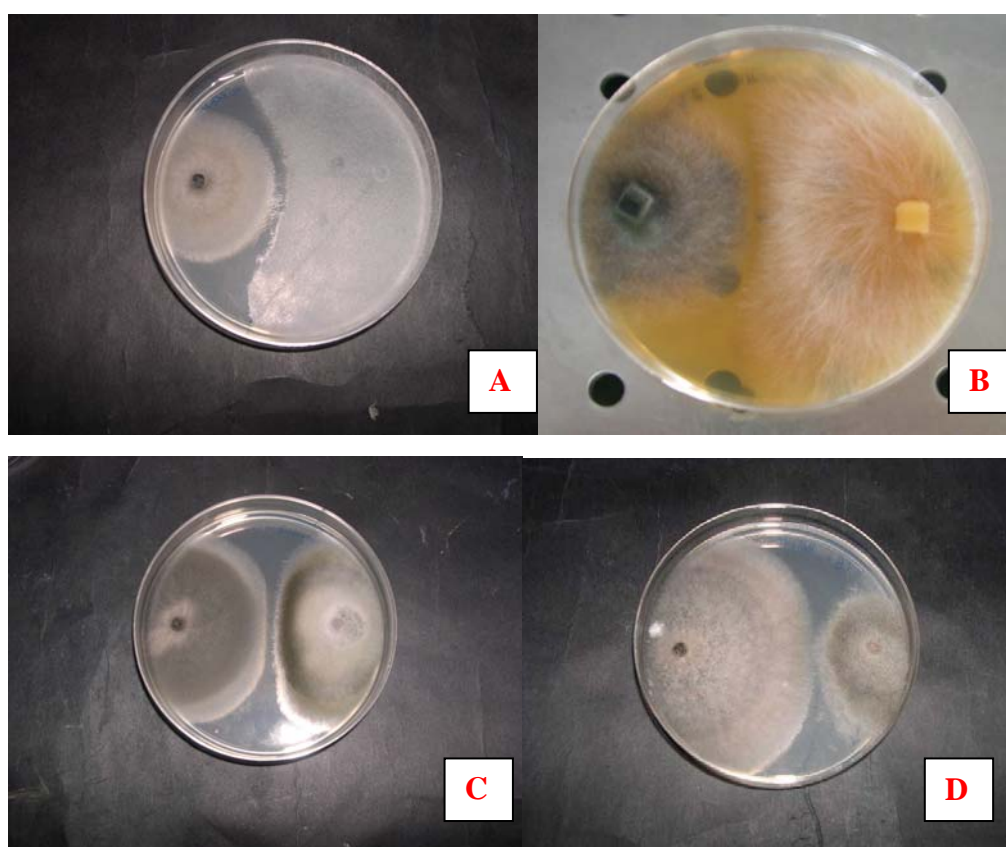
### 3.2.3. Saggi di antagonismo *in vitro* nei confronti di funghi fitopatogeni

Per valutare l'attività antagonista del ceppo 678 di *Drechslera* spp. sono stati allestiti saggi *in vitro* nei confronti dei patogeni *P. ultimum*, *R. solani*, *A. alternata* e *B. cinerea*. Sia l'antagonista che i patogeni sono stati accresciuti su piastre di PDA alla temperatura di 25°C per 14 giorni.

Dischetti di agar di 5 mm di diametro contenenti il micelio del ceppo 678 sono stati posti su piastre di PDA ed incubati a 25°C. Dopo 4 giorni su ciascuna piastra è stato trasferito anche il patogeno.

La capacità antagonista è stata valutata in base all'ampiezza dell'alone di inibizione formatosi in seguito alla crescita dei due microrganismi.

Il ceppo 678 si è mostrato in grado di inibire tutti patogeni. In particolare, la crescita di *P. ultimum* è stata inibita del 53%, quella di *R. solani* del 33% mentre *B. cinerea* e *A. alternata* sono stati inibiti rispettivamente del 33 e del 45% (figura 36).



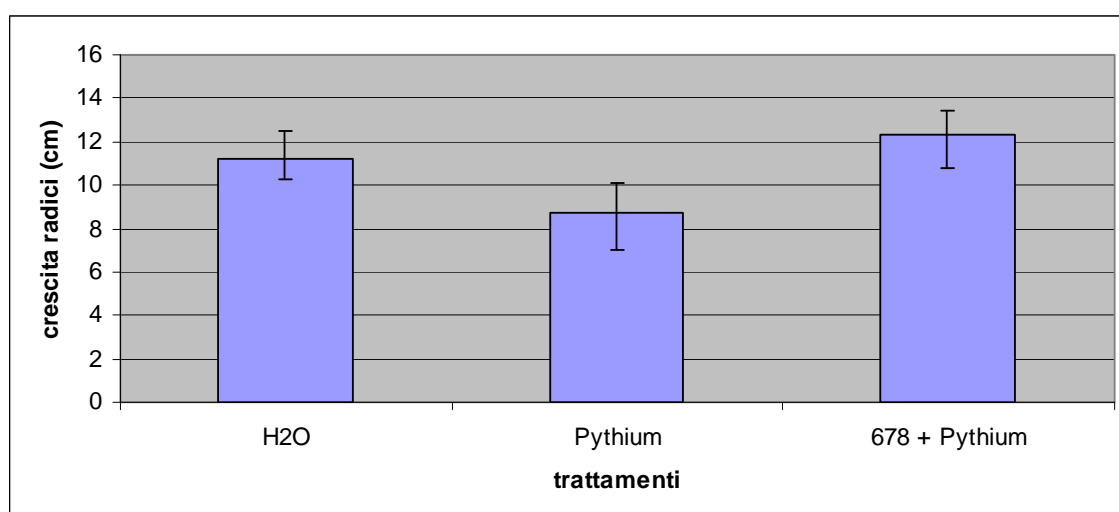
**Figura 36.** Saggi di antagonismo *in vitro* del ceppo 678 nei confronti di *P. ultimum* (A), *R. solani* (B), *A. alternata* (C) e *B. cinerea* (D).

### 3.2.4. Saggi di biocontrollo *in vivo* nei confronti di patogeni terricoli

La capacità di biocontrollo di *Drechslera* spp. ceppo 678 è stata valutata nei confronti di *R. solani* e *P. ultimum*.

La biomassa del ceppo 678 è stata distribuita uniformemente in terreno sterile. Dopo 4 giorni, al terreno trattato con l'antagonista è stata aggiunta la biomassa del patogeno e i semi di pomodoro precedentemente sterilizzati.

La presenza del ceppo 678 in terreno infettato con *P. ultimum* non ha migliorato significativamente la percentuale dei semi germinati (dati non mostrati) ma ha comunque favorito lo sviluppo delle radici sia rispetto al controllo sia rispetto al trattamento con il patogeno (figura 37).

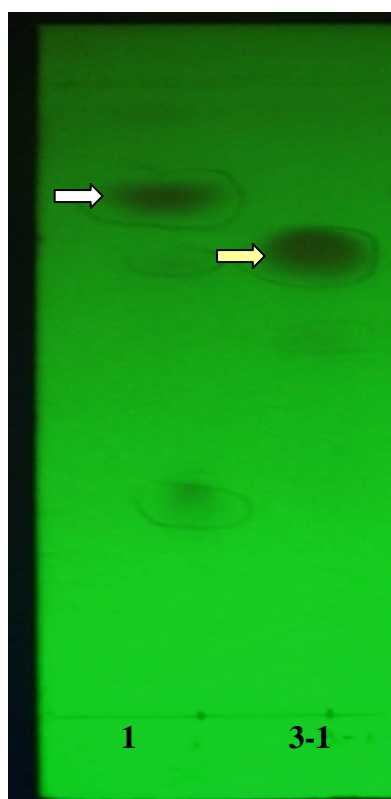


**Figura 37.** Crescita delle radici di piante di pomodoro in presenza del patogeno e del ceppo 678. H<sub>2</sub>O = controllo; *Pythium* = trattamento del terreno sterile con *P. ultimum*; 678 + *Pythium* = trattamento del terreno sterile con *P. ultimum* e *Drechslera* spp. ceppo 678.

Nei confronti di *R. solani*, invece, non è stato osservata nessuna riduzione significativa degli effetti negativi dovuti alla presenza del patogeno sia in termini di percentuale di semi germinati sia di sviluppo radicale (dati non mostrati).

### 3.2.5. Isolamento e caratterizzazione dei metaboliti secondari prodotti dal ceppo 678 di *Drechslera* spp.

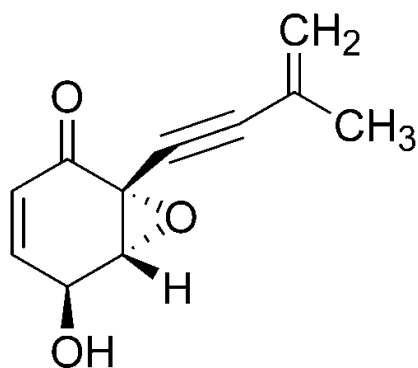
Il residuo oleaginoso (184,7 mg) ottenuto dal filtrato colturale del ceppo 678 è stato sottoposto a cromatografia su colonna a pressione atmosferica (gel di silice). Sono state raccolte 18 frazioni e quelle con lo stesso profilo cromatografico sono state riunite ed ulteriormente purificate mediante TLC preparativa. In particolare, sono state ulteriormente purificate la frazione 1 (10,7 mg) e la frazione 3-1 (11,8 mg) mostrate in figura 38.



**Figura 38.** TLC analitica delle frazioni 1 e 3-1 mediante esposizione a lampada UV

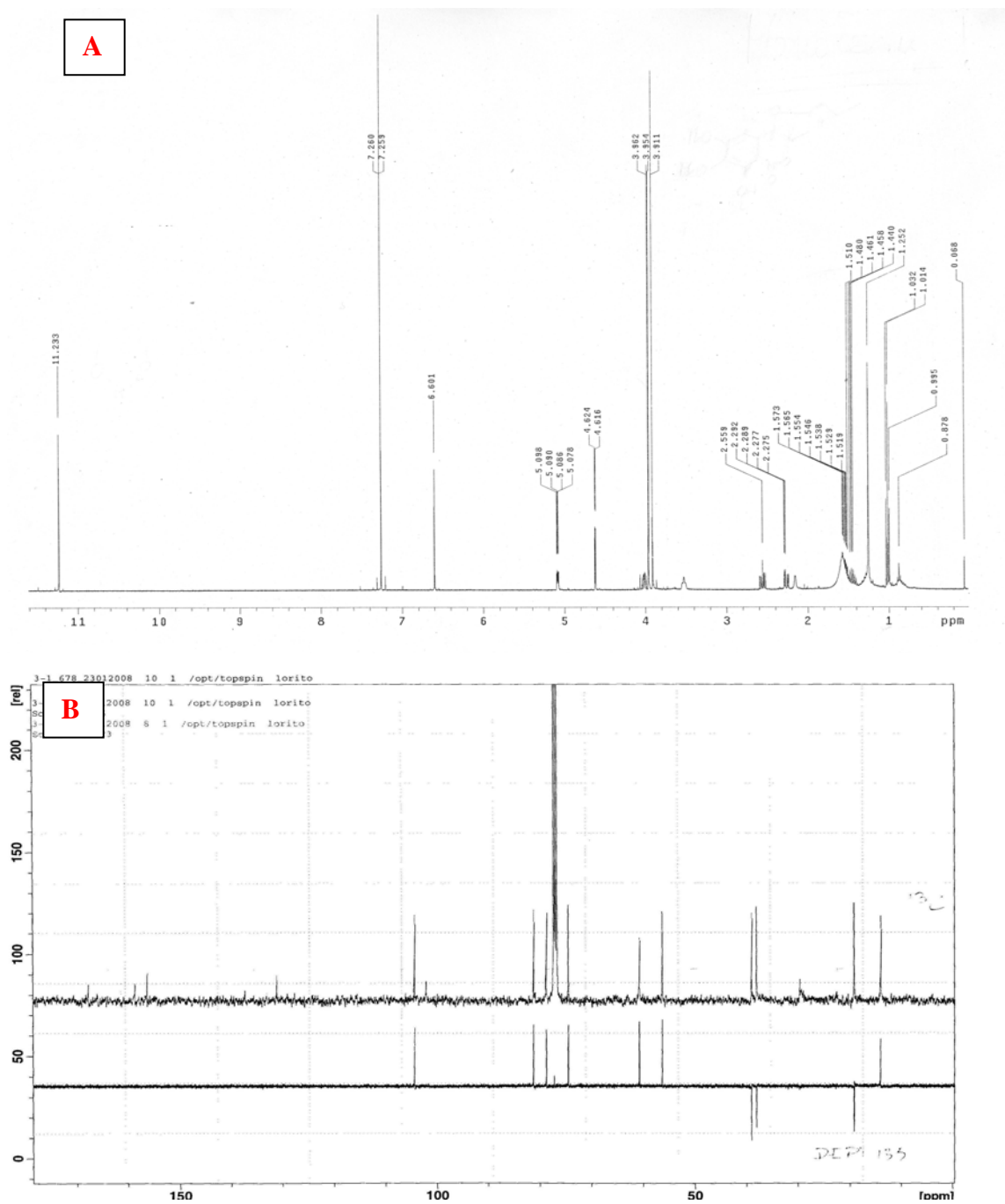
L'analisi NMR ha mostrato che il principale metabolita presente nella frazione 1 (freccia bianca figura 38) presenta gli stessi segnali del derivato dell'epoxycicloexenolone riportato in figura 39 (Kim *et al.*, 2006).





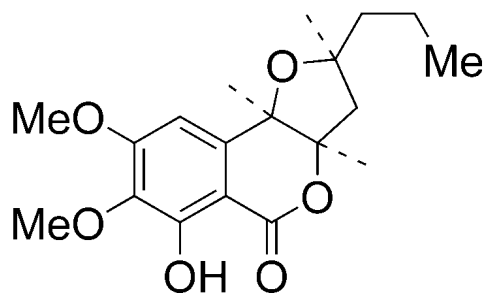
**Figura 39.** Derivato dell'epoxycicloexenolone: (5-Hydroxy-1-(3-oxo-but-1-ynyl)-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-2-one).

Grazie alle analisi degli spettri NMR mono (figura 40) e bidimensionali (figura 41) e degli spettri di massa in LC/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)(figura 42) è stato possibile identificare il metabolita della frazione 3-1 (freccia gialla figura 38). Il metabolita isolato presentava gli stessi segnali riportati in letteratura (Scott *et al.*, 1984; Mallareddy e Rao, 1996; Aldridge e Turner, 1970) per la monocerina (figura 43).



**Figura 40.** Spettro  $^1\text{H}$  NMR (A) e  $^{13}\text{C}$  + DEPT (B) della monocerina.





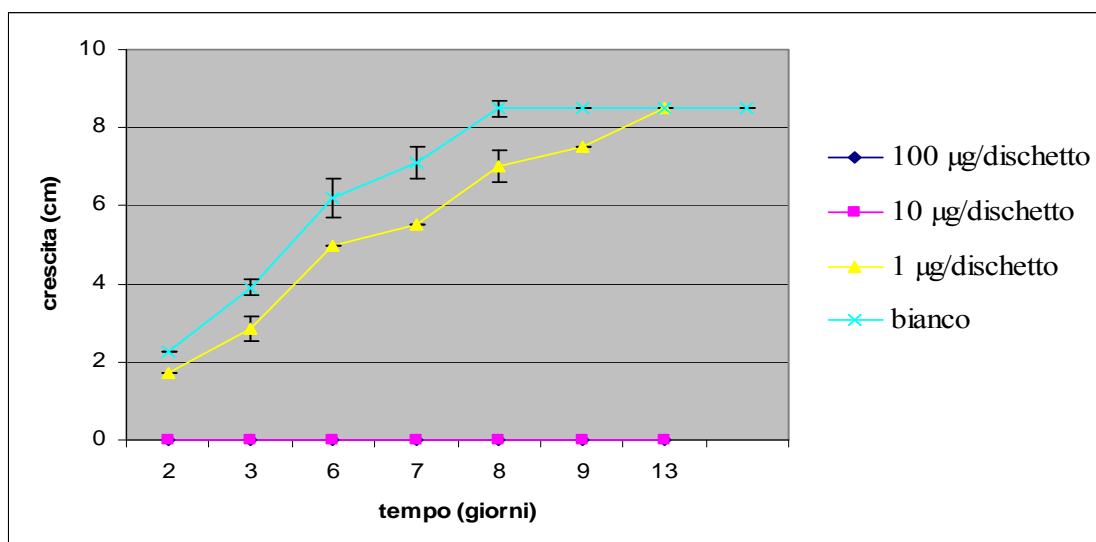
**Figura 43.** Monocerina.

### 3.2.6. Saggi di antibiosi *in vitro* nei confronti di funghi fitopatogeni

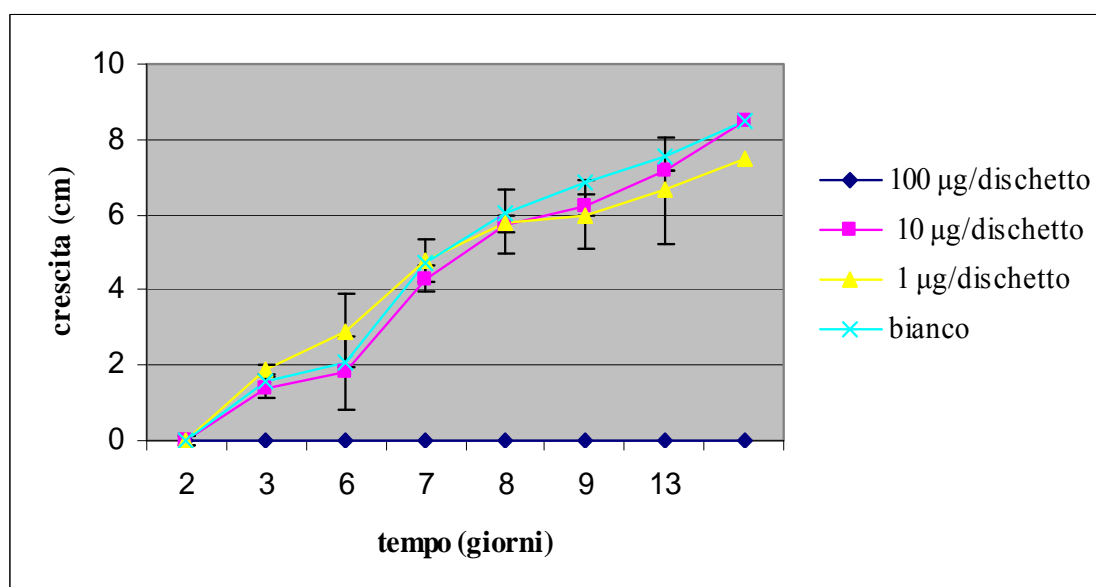
L'attività antibiotica dei 2 principali metaboliti secondari purificati dal ceppo 678 (un derivato dell'epoxycicloexenolone e la monocerina) è stata saggiata nei confronti del patogeno fogliare *B. cinerea* e del patogeno terricolo *S. sclerotiorum*.

Entrambi i metaboliti sono stati applicati su dischetti di agar prelevati dal micelio in crescita dei patogeni a tre diverse concentrazioni, ovvero 1, 10 e 100 µg per dischetto.

Dai risultati ottenuti è apparso evidente che il derivato dell'epoxycicloexenolone è in grado di inibire totalmente il patogeno *S. sclerotiorum* applicando 100 µg e 10 µg dell'antibiotico. Non è stata osservata nessuna inibizione significativa del patogeno applicando la concentrazione più bassa del metabolita (figura 44). Anche *B. cinerea* viene totalmente inibito aggiungendo al patogeno 100 µg dell'antibiotico mentre l'inibizione è ridotta o nulla a concentrazioni inferiori (figura 45).

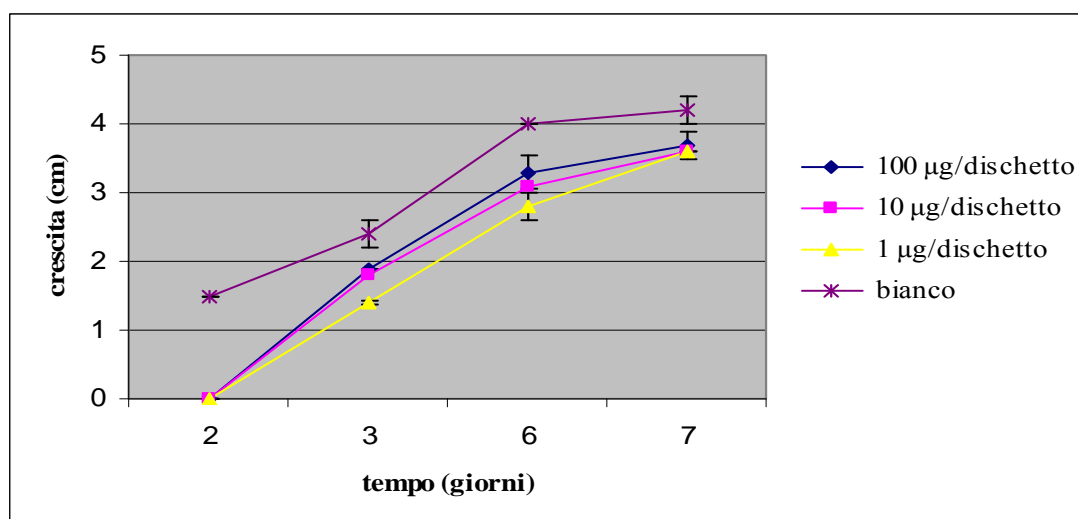


**Figura 44.** Attività del derivato dell'epoxycicloexenolone nei confronti di *S. sclerotiorum*. Bianco = controllo; ◆ = 100 µg del metabolita per dischetto; ■ = 10 µg del metabolita per dischetto; ▲ = 1 µg del metabolita per dischetto.

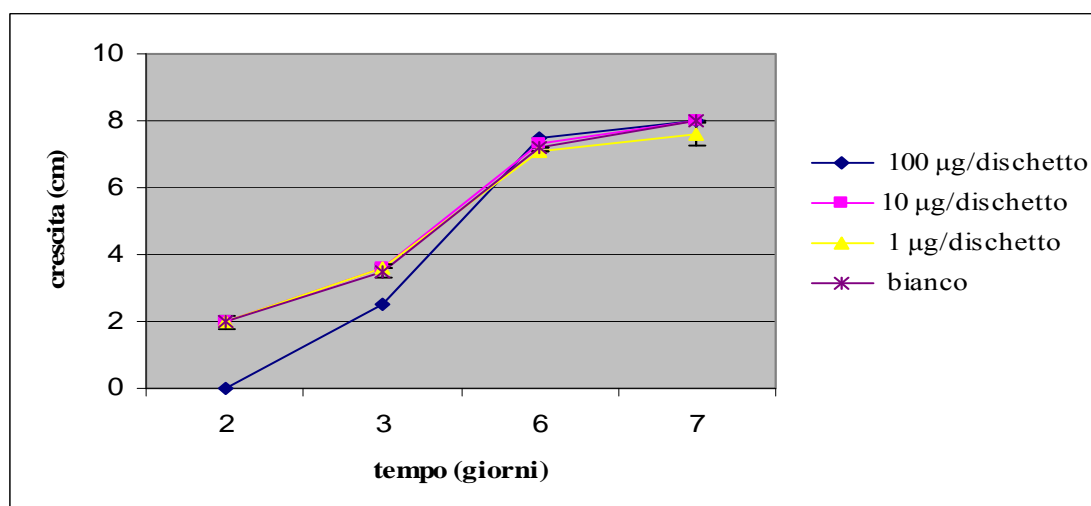


**Figura 45.** Attività del derivato dell'epoxycicloexenolone nei confronti di *B. cinerea*. Bianco = controllo; ◆ = 100 µg del metabolita per dischetto; ■ = 10 µg del metabolita per dischetto; ▲ = 1 µg del metabolita per dischetto.

I patogeni *S. sclerotiorum* e *B. cinerea* si sono mostrati più sensibili nei confronti del secondo metabolita prodotto dal ceppo 678, ovvero la monocerina. 100 µg dell'antibiotico riescono ad inibire entrambi i patogeni solo durante i primi 2 giorni del saggio. Applicando 10 µg ed 1 µg è stata rallentata la crescita di *S. sclerotiorum* (figura 46) mentre non è stata osservata nessuna inibizione del patogeno *B. cinerea* (figura 47).



**Figura 46.** Attività della monocerina nei confronti di *S. sclerotiorum*. Bianco = controllo; ♦ = 100 µg del metabolita per dischetto; ■ = 10 µg del metabolita per dischetto; ▲ = 1 µg del metabolita per dischetto.



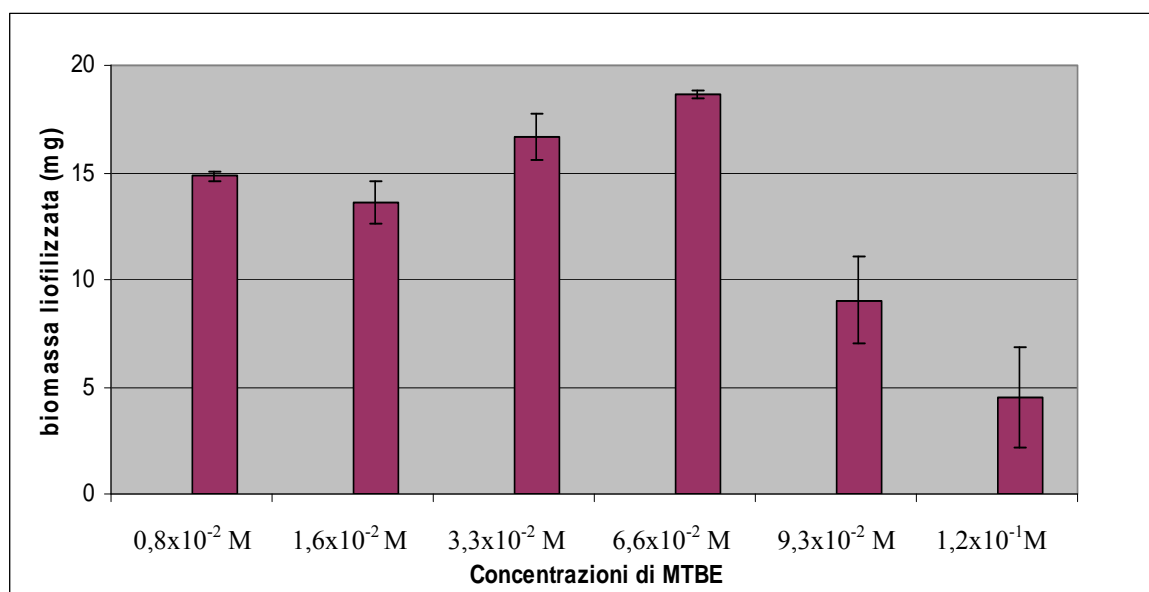
**Figura 47.** Attività della monocerina nei confronti di *B. cinerea*. Bianco = controllo; ♦ = 100 µg del metabolita per dischetto; ■ = 10 µg del metabolita per dischetto; ▲ = 1 µg del metabolita per dischetto.

### 3.3. *T. harzianum* ceppo T22

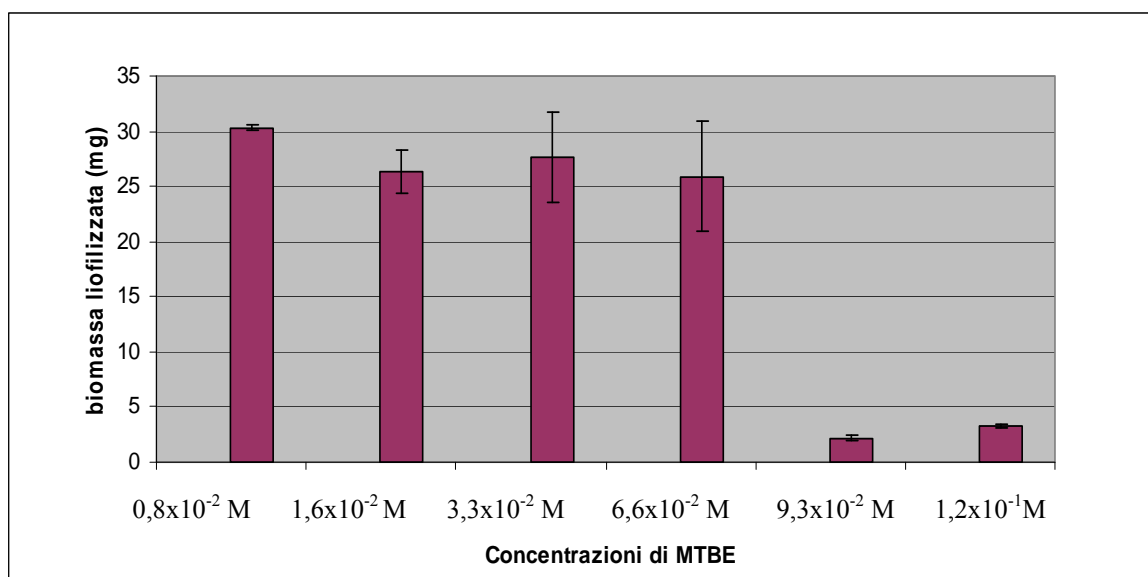
#### 3.3.1. Crescita di *T. harzianum* ceppo T22 in presenza di MtBE

*T. harzianum* ceppo T22 è stato inoculato in substrato salino contenente concentrazioni crescenti di MtBE ( $0,8 \times 10^{-2}$  M,  $1,6 \times 10^{-2}$  M,  $3,3 \times 10^{-2}$  M,  $6,6 \times 10^{-2}$  M,  $9,3 \times 10^{-2}$  M e  $1,2 \times 10^{-1}$  M) ed è stato valutato il peso della biomassa liofilizzata prodotta 14 giorni dopo l'inoculo. Dai risultati ottenuti è apparsa evidente la capacità del ceppo T22 di crescere in presenza di MtBE, sia quando inoculato direttamente da spore (figura 48), sia mediante “culture replacement” a partire da coltura starter in mezzo ricco di nutrienti (figura 49).

La concentrazione di inquinante pari a  $9,3 \times 10^{-2}$  M è risultata il limite di tolleranza del MtBE oltre il quale la crescita fungina viene fortemente inibita.



**Figura 48.** Biomassa liofilizzata prodotta dal ceppo T22 dopo 14 giorni dall'inoculo da spore in substrato salino contenente concentrazioni crescenti di MtBE.



**Figura 49.** Biomassa liofilizzata prodotta dal ceppo T22 14 giorni dopo l'inoculo con coltura starter in substrato salino contenente concentrazioni crescenti di MtBE.

### 3.3.2. Degradazione del MtBE ad opera di *T. harzianum* ceppo T22

La capacità di degradare il MtBE da parte di T22 è stata saggiata al fine di valutare la possibilità di utilizzare questo ceppo fungino per il biorisanamento di siti contaminati. Dopo 7 giorni di crescita in substrato salino addizionato di diverse concentrazioni di MtBE (le stesse riportate nel paragrafo precedente), è stata calcolata la percentuale di degradazione dell'inquinante nel substrato mediante analisi GC/FID.

Il ceppo T22 è stato in grado di degradare il contaminante a tutte le concentrazioni del saggio come riportato in tabella 8.



**Tabella 8.** Percentuale di degradazione del MtBE ad opera di T22 7 giorni dopo l'inoculo in mezzo salino.

Ceppo utilizzato	Concentrazioni di MtBE	Percentuale di degradazione
<i>T. harzianum</i> T22	$0,8 \times 10^{-2}$ M	40%
	$1,6 \times 10^{-2}$ M	40%
	$3,3 \times 10^{-2}$ M	15%
	$6,6 \times 10^{-2}$ M	42%

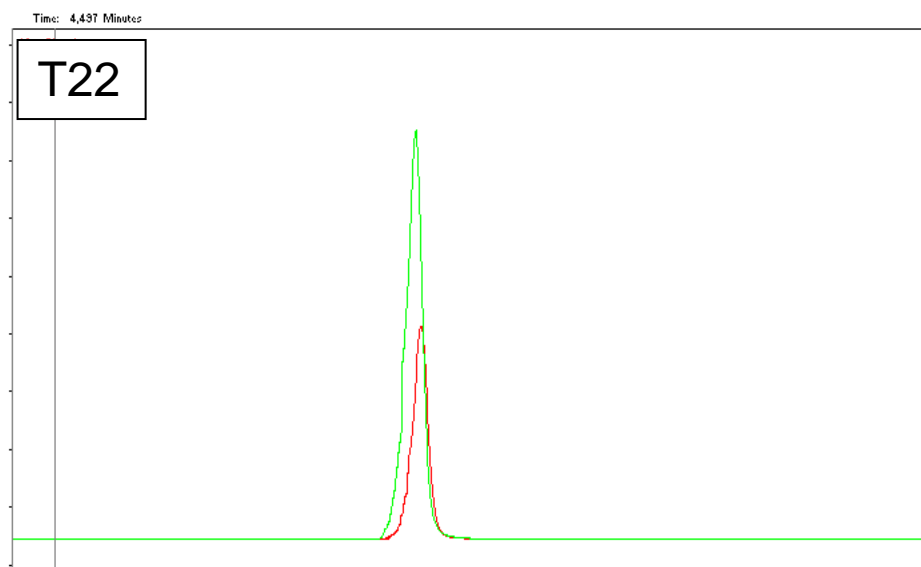
La biomassa ottenuta allevando il ceppo fungino in presenza di MtBE è stata raccolta e successivamente re-inoculata in un substrato fresco addizionato con le medesime concentrazioni della sostanza inquinante utilizzate nell'incubazione precedente.

Sette giorni dopo il re-inoculo la percentuale di degradazione del MtBE è apparsa notevolmente aumentata.

In particolare, i risultati più significativi sono collegati alla degradazione del contaminante alla concentrazione di  $3,3 \times 10^{-2}$  M che è apparsa raddoppiata passando dal 15 al 32%. Inoltre, il ceppo T22 è stato in grado di degradare il MtBE di oltre il 50% quando questo era presente ad una concentrazione pari a  $6,6 \times 10^{-2}$  M (tabella 9 - figura 50).

**Tabella 9.** Percentuale di degradazione del MtBE ad opera di T22 7 giorni dopo il re-inoculo in mezzo salino.

Ceppo utilizzato	Concentrazioni di MtBE	Percentuale di degradazione
<i>T. harzianum</i> T22	$3,3 \times 10^{-2}$ M	32%
	$6,6 \times 10^{-2}$ M	52%



**Figura 50.** Analisi GC/FID dell'estratto in  $\text{CHCl}_3$  al termine della crescita di T22 in mezzo contaminato da MtBE (area circoscritta dalla linea verde = controllo non trattato; area circoscritta dalla linea rossa = trattato con T22). Tempo di ritenzione del MtBE nelle condizioni del saggio: 4,300 minuti.

## 4. DISCUSSIONE

---

Funghi e batteri sono microrganismi ubiquitari in grado di resistere a condizioni ambientali estremamente sfavorevoli e, in virtù delle loro caratteristiche e potenzialità, hanno trovato larga applicazione in svariati settori, compreso quello ambientale ed agrario. La componente microbica presente nei suoli, infatti, svolge un ruolo chiave nella bonifica di aree contaminate da sostanze inquinanti di varia natura (idrocarburi, metalli pesanti, pesticidi, etc.). Molti trattamenti di decontaminazione ambientale necessitano di microrganismi specializzati in grado di metabolizzare l'inquinante convertendolo in un prodotto meno tossico e meno mobile. Laddove non è possibile sfruttare la biomassa indigena si può inoculare il terreno da bonificare con colture specializzate, isolate da suoli contaminati dal medesimo composto e selezionati in laboratorio (Stocking *et al.*, 2000).

Altrettanta rilevanza sta assumendo in agricoltura l'utilizzo di diverse specie di funghi e batteri per il controllo biologico di importanti fitopatie. Un sistema agricolo deve essere in grado di fornire prodotti alimentari di elevata qualità, sicuri, diversificati. Tale capacità deve poter persistere invariata negli anni, a vantaggio delle generazioni future. Negli ultimi decenni le tecniche di lotta biologica per il controllo delle fitopatie hanno suscitato un interesse sempre crescente, dal momento che la tradizionale lotta chimica sta facendo emergere numerose problematiche non solo a livello ambientale, ma anche igienico-sanitario ed economico. L'uso eccessivo di fitofarmaci, infatti, non solo contribuisce all'inquinamento del terreno e delle acque, ma spesso il loro impiego porta a selezionare popolazioni resistenti di parassiti e ad interferire con la microflora e/o microfauna utile. Attualmente sono sempre maggiori gli sforzi per elaborare nuove strategie di lotta verso le fitopatie che rappresentino una valida alternativa all'uso di sostanze chimiche di sintesi, nell'ottica di sviluppare un'agricoltura maggiormente rispettosa della natura e dell'uomo (Cook, 2000).

Data la presenza nei nostri suoli e terreni agricoli di un elevato numero di patogeni, fitofarmaci ed inquinanti di varia natura, con questo lavoro abbiamo voluto selezionare microrganismi in grado allo stesso tempo di proteggere la pianta dalla presenza sia di patogeni sia di inquinanti antropici. Di conseguenza, data la naturale propensione delle

piante ad estrarre le sostanze presenti nel terreno, si eviterebbe l'accumulo di contaminanti o loro derivati nelle derrate alimentari e nei prodotti finali.

In quest'ottica, sono stati studiati:

- ceppi batterici isolati da siti contaminati da idrocarburi;
- il ceppo 678 del fungo terricolo *Drechslera* spp.;
- il ceppo T22 di *T. harzianum*.

I batteri sono tra i protagonisti dei processi di biorisanamento poiché sono in grado di produrre una molteplicità di enzimi che degradano la sostanza organica; hanno, inoltre, una velocità di moltiplicazione generalmente superiore a quella degli altri microrganismi presenti nella matrice contaminata (Sorlini, 2005). L'efficienza, e quindi l'efficacia, del processo complessivo di degradazione degli inquinanti nel suolo così come nelle acque è comunque da attribuire ad un consorzio di microrganismi (Colwell e Walker, 1997). Già da molti decenni i microbiologi ambientali hanno isolato e caratterizzato diverse specie batteriche in grado di crescere su complesse o inusuali fonti di energia (idrocarburi, solventi, pesticidi, erbicidi etc.).

In questo lavoro sono stati isolati ed identificati 16 ceppi batterici in grado di crescere in presenza di un composto altamente inquinante quale il MtBE. L'attuale largo impiego di MtBE come additivo delle benzine è legato alle sue proprietà chimico-fisiche, ai vantaggi tecnici e alla facilità di stoccaggio. Esso, infatti, presenta un elevato numero di ottani, ha una modesta reattività a temperatura ambiente (che ne agevola la gestione ed il trasporto) ed un costo relativamente basso. L'utilizzo del MtBE ha ridotto notevolmente le emissioni di monossido di carbonio, ossido d'azoto e composti organici volatili, nonché di polveri sottili (EFOA, 2000). Tuttavia, l'impiego di questa sostanza nei carburanti suscita non poche perplessità in termini di sicurezza ambientale. Esso è difficilmente accessibile ai microrganismi a causa sia della stabilità del legame etere in esso contenuto (Hardison *et al.*, 1997), sia della sua elevata solubilità in acqua. Infatti, mentre il valore medio di solubilità in acqua degli idrocarburi non supera generalmente 0,15 g/Lt, quello del MtBE è di circa 50 g/Lt. Questo contaminante, inoltre, non viene trattenuto negli strati superficiali del terreno e, una volta raggiunta la falda acquifera profonda, si disperde facilmente e vi resta per tempi indefiniti, in quanto scarsamente degradabile.

Ciò rende molto difficoltosa la scelta dei microrganismi da utilizzare nei programmi di recupero ambientale di suoli e acque contaminati da questo composto. Tra i microrganismi identificati in questo lavoro sono stati selezionati quelli che hanno mostrato la maggiore capacità di degradare il contaminante, ovvero *Bacillus* sp. -ceppo R1B-, *Thiobacillus* sp. -ceppo R8b- e *Mycobacterium mucogenicum* -ceppo R8i.

Gli isolati batterici selezionati sono stati tutti in grado di tollerare le concentrazioni di MtBE impiegate nei saggi (50, 100 e 500 ppm), mostrando tuttavia una diversa capacità di degradazione dell'inquinante. In particolare, dopo 7 giorni di crescita i ceppi di *Thiobacillus* sp. e *Mycobacterium* hanno ridotto, rispettivamente, del 74 e 87% la concentrazione iniziale di MtBE presente nel mezzo di coltura (100 ppm nel caso di *Thiobacillus* sp. e 500 ppm per *Mycobacterium*), laddove il ceppo di *Bacillus* sp. ha mostrato una discreta capacità di degradazione ma una crescita più stentata.

I risultati ottenuti sono in accordo con quanto descritto in altri lavori. Muñoz-Castellanos *et al.*, (2006) hanno isolato 12 colture pure in base alla loro capacità di crescere a concentrazioni di MtBE superiori a 500 ppm. Tra i ceppi batterici isolati, quelli appartenenti al genere *Bacillus* sono stati predominanti, seguiti da *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Aureobacterium* e *Proteus*. Dei 12 ceppi selezionati 6 sono riusciti a degradare il MtBE da un minimo del 22 ad un massimo del 37%.

Okeke e Frankenberger (2002) hanno evidenziato la capacità di *Streptomyces* sp. (IsoSL1) e *Sphingomonas* sp. (Iso2A) di degradare fino al 50% di MtBE dopo 28 giorni di incubazione, mentre Mo *et al.*, (1997) hanno studiato la degradazione del medesimo inquinante ad opera di *A. ilicis*, *M. mesophilicum* e *Rhodococcus* sp., risultati in grado di rimuovere circa il 30% di MtBE in 2 settimane.

In esperimenti analoghi sono state valutate le capacità biodegradative di due funghi terricoli, il ceppo 678 di *Drechslera* spp. ed il ceppo T22 di *T. harzianum*.

Il genere *Drechslera* contiene alcune specie studiate per la produzione di sostanze naturali, quali ofioboline, triticoni A e B e sesquiterpeni (Sugawara, 1987; Evidente, 2006). Molto poco si conosce circa l'uso di questo microrganismo fungino per la degradazione di sostanze inquinanti. Nel 2005 Obuekwe *et al.*, hanno studiato la capacità di *Drechslera* sp., in condizioni di stress (NaCl e alte temperature), di degradare il petrolio osservando una degradazione del 30%.

Il ceppo 678 utilizzato in questo lavoro aveva già precedentemente mostrato capacità di biocontrollo nei confronti di *G. graminis* var. *tritici* (Kim *et al.*, 2006), ma non era stata ancora valutata la possibilità di impiegarlo quale agente di biorisanamento. I risultati

ottenuti hanno mostrato discreti livelli di degradazione (88 e 64%) del MtBE quando questo era presente nel mezzo di coltura, rispettivamente, alle concentrazioni di 50 e 100 ppm.

Per quanto riguarda il ceppo T22 di *T. harzianum*, invece, i risultati ottenuti da questo lavoro hanno mostrato la capacità di tale microrganismo fungino di crescere in presenza di concentrazioni crescenti di MtBE, sia quando inoculato direttamente sotto forma di spore, sia a partire da coltura starter in mezzo ricco di nutrienti. In particolare, il ceppo T22 è stato in grado di degradare il MtBE di oltre il 50% quando questo era presente ad una concentrazione pari a  $6,6 \times 10^{-2}$  M.

Se da un lato l'abilità di T22 di crescere in presenza del MtBE non era ancora nota, dall'altro le sue applicazioni nella lotta biologica quale agente antagonista sono note da tempo. In America questo ceppo costituisce l'efficace principio attivo di noti formulati commerciali (Rootshield e Plantshield, Biowork, USA) utilizzati per il controllo di importanti patogeni terricoli e fogliari su diverse colture.

I funghi appartenenti al genere *Trichoderma* sono tra i maggiori agenti di biocontrollo attualmente impiegati per il controllo delle fitopatie sia in condizioni di serra che di pieno campo (Harman *et al.*, 2004; Lewis e Papavizas, 1987; Otieno *et al.*, 2003; Chet e Inbar, 1994; Harman *et al.*, 1996; Elad, 2000; Hjeljord *et al.*, 2000). Attualmente, circa un terzo dei prodotti commerciali presenti sul mercato che utilizzano i funghi come principio attivo sono a base di *Trichoderma* (Vannacci e Gullino, 2000). Questi microrganismi fungini hanno mostrato elevata capacità di interazione con la pianta promuovendone la crescita, sia dell'apparato radicale sia della parte aerea (Harman, 2000). E' stato inoltre evidenziato che la colonizzazione dei primi stadi corticali della radice da parte di *Trichoderma* spp. è correlata all'induzione di fenomeni di resistenza sistemica o localizzata in pianta (Shores *et al.*, 2005; Yedidia *et al.*, 1999, 2000, 2003). Alcuni ceppi di *Trichoderma*, infatti, sono potenti induttori di resistenza sistemica (ISR) (Harman *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2006; Woo e Lorito, 2007). L'invasione delle radici da parte di *Trichoderma* provoca un incremento di proteine correlate alla patogenesi (PR-protein) (Howell *et al.*, 2000; Harman *et al.*, 2004), ma induce anche la produzione di enzimi coinvolti nella biosintesi di composti antimicrobici come le fitoalessine. In tal modo *Trichoderma* spp. sono in grado, non solo di produrre direttamente composti tossici nei confronti di patogeni, ma anche di stimolare fortemente le piante a produrre i propri metaboliti di difesa, favorendo il controllo della resistenza a varie classi di funghi patogeni.

Oltre che con la pianta, *Trichoderma* interagisce positivamente anche con funghi e batteri benefici. E' stato osservato, infatti, che alcune specie di *Trichoderma* hanno un effetto di tipo sinergico sia con i PGPRs (Plant Growth Promoter Rhizobacteria) che con alcuni funghi micorizzici (Calvet *et al.*, 1993).

Oltre al loro impiego nel controllo biologico, alcune specie di *Trichoderma* trovano larga applicazione in altri settori (Kubicek *et al.*, 1990; Molla *et al.*, 2002). Numerosi lavori hanno dimostrato che i funghi del genere *Trichoderma* hanno sviluppato dei complessi meccanismi di inattivazione e di detossificazione che li rendono molto resistenti a una varietà di tossine e composti xenobiotici, incluso antibiotici prodotti da altri microrganismi, composti antimicrobici di origine vegetale e fungicidi di sintesi (Harman *et al.*, 1996). Studi più recenti hanno evidenziato anche la capacità di alcuni ceppi di degradare composti inquinanti quali idrocarburi policiclici aromatici (IPA), arsenico, cianuro, polifenoli e nitrati (Ma *et al.*, 2001; Ravelet *et al.*, 2000; Ezzi e Lynch, 2002; Harman, 2000).

Il ceppo T22 in associazione con le radici di piante di felci (*Osmunda Cinnamomea*) riesce a ridurre i livelli di arsenico nei suoli contaminati e contemporaneamente favorisce lo sviluppo radicale della pianta (Harman *et al.*, 2004).

Alcuni ceppi di *Trichoderma* sono in grado di ridurre i livelli di fertilizzanti azotati del 40-50% (Harman, 2000; Harman e Donzelli, 2001).

Di recente è stato proposto l'utilizzo di *Trichoderma* spp. nei processi di bioremediation di suoli contaminati da cianuro grazie alla capacità di questo microrganismo di produrre due importanti enzimi (la foramide idrolasi e la rodanasi) in grado di degradare tale inquinante (Ezzi e Lynch, 2002; Ezzi *et al.*, 2003).

Le capacità di biocontrollo messe in atto dagli altri microrganismi oggetto di indagine sono state invece saggiate per la prima volta nel presente studio mediante test di antagonismo *in vitro* ed *in vivo* nei confronti di diversi funghi fitopatogeni e saggi di induzione di resistenza sistemica (ISR) in pianta. *In vitro* i risultati più interessanti sono stati ottenuti dall'azione dei ceppi R8b di *Thiobacillus* sp. e R1B di *Bacillus* sp. In particolare, il ceppo R8b ha inibito la crescita di *B. cinerea*, *P. ultimum* e *A. alternata* rispettivamente del 50, 39 e 24%. Il ceppo R1B, invece, è stato in grado di inibire *A. alternata* e *P. ultimum* rispettivamente del 32 e 25 %.

L'efficacia *in vivo* di questi stessi ceppi batterici ha ridotto lo sviluppo di aree necrotiche sulle foglie già 48 ore dopo l'inoculo dei patogeni *B. cinerea* e *A. alternata*. Il ceppo R8i di *M. mucogenicum* ha, invece, efficacemente controllato *B. cinerea* solo a

partire dalle 72 ore successive all'inoculo. Risultati simili sono stati ottenuti anche nei confronti del patogeno terricolo *P. ultimum*, dove l'applicazione dei ceppi batterici isolati dai siti contaminati ha determinato anche un aumento della germinazione dei semi.

Anche il ceppo 678 del fungo terricolo *Drechslera* spp. si è mostrato un buon agente di biocontrollo, sia nelle prove di antagonismo *in vitro*, sia nei saggi *in vivo*.

Nei saggi di antagonismo *in vitro*, infatti, il ceppo 678 è riuscito ad inibire la crescita di *P. ultimum*, *R. solani*, *A. alternata* e *B. cinerea* rispettivamente del 53, 33, 45 e 33%.

Saggi di biocontrollo *in vivo* nei confronti di *P. ultimum*, invece, hanno evidenziato la capacità del fungo 678 di ridurre gli effetti negativi della patologia, favorendo lo sviluppo radicale delle piantine trattate. In un precedente studio, Worth (2002) aveva dimostrato che questo ceppo di *Drechslera* spp. era in grado di inibire *in vitro* la crescita di *G. graminis* var. *tritici*, ma anche di favorire la crescita delle radici di piantine di grano.

Oltre all'inibizione diretta dei patogeni, alcuni microrganismi antagonisti possono interagire con la pianta attraverso processi di colonizzazione, aumento della biodisponibilità di nutrienti, produzione di sostanze utili al metabolismo della pianta e induzione dei meccanismi di resistenza (ISR). In quest'ultimo caso l'agente di biocontrollo è in grado di ampliare e potenziare le capacità di difesa della pianta, che risulta così meno suscettibile agli attacchi degli agenti fitopatogeni (Van Loon, 2000; Oostendorp *et al.*, 2001; Kloepper *et al.*, 2004). La ISR, infatti, conferisce alla pianta una protezione aspecifica, in quanto amplia lo spettro di resistenza anche nei confronti di agenti fitopatogeni che non sono suscettibili agli antibiotici e/o metaboliti tossici prodotti dall'agente di biocontrollo. Tale protezione si estende anche ai tessuti non inoculati o non esposti all'induttore, e ciò può rappresentare un notevole vantaggio, poiché applicando l'agente di biocontrollo ad esempio alle radici, la pianta risulta essere più resistente anche a patogeni fogliari.

In letteratura sono numerosi gli esempi di batteri utilizzati nel controllo biologico di importanti fitopatie. Killian *et al.*, (2000) hanno studiato la capacità di *B. subtilis* FZB 24 di colonizzare le radici, promuovendo la crescita e lo sviluppo delle piante, e indurre resistenza sistemica in pianta. Studi condotti da Domenech *et al.* (2006) hanno dimostrato che l'utilizzo del prodotto commerciale LS213 (a base di *B. subtilis* GB03, *B. amyloliquefaciens* IN937 e chitosano) in associazione con 3 PGPR (*B. licheniformis* 5106, *P. fluorescens* 5398 e *Chryseobacterium balustinum* 5399) ha avuto un effetto



sinergico in termini sia di promozione della crescita di piante di pomodoro e sia di biocontrollo contro *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia* spp. Saggi *in vitro* condotti da Chen *et al.* (2008) hanno evidenziato la capacità di *B. subtilis* JA di inibire la sporulazione di *B. cinerea*, mentre Zhang *et al.*, (2008) hanno verificato l'attività antagonista di 2 ceppi di *B. subtilis* (KB-1111 e KB-1122) nei confronti di *Magnaporthe grisea*, *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum*.

A differenza di quanto osservato nei saggi di controllo diretto, dei 3 isolati batterici selezionati solo il ceppo R8i di *M. mucogenicum* è stato in grado di indurre resistenza in piante di pomodoro contro il patogeno fogliare *B. cinerea*.

Uno dei meccanismi fondamentali grazie al quale i microrganismi antagonisti svolgono la loro azione di contenimento della popolazione patogena include l'inibizione del patogeno attraverso la produzione di composti antimicrobici (antibiosi) (Whipps, 1997). A tale proposito nel presente lavoro sono stati estratti, purificati ed identificati i principali metaboliti secondari prodotti *in vitro* dai ceppi batterici e fungini oggetto di indagine. Grazie all'analisi degli spettri NMR e degli spettri di massa (LC/MS e HRMS) è stato possibile identificare la struttura della maculosina prodotta dal ceppo R8b di *Thiobacillus* sp. Questo metabolita è prodotto da diversi batteri (Cain *et al.*, 2003) e funghi (Stierle *et al.*, 1988; Bobylev *et al.*, 1996; Saxena e Pandey, 2001) ed in letteratura è riportato il suo utilizzo come erbicida biologico nel controllo delle erbe infestanti (Bobylev *et al.*, 1996). In questo lavoro l'attività antibiotica della maculosina è stata saggiata *in vitro* nei confronti di diversi funghi fitopatogeni. I risultati ottenuti hanno evidenziato la capacità di tale metabolita di controllare la crescita di *R. solani* se applicata alla concentrazione di 100 µg per dischetto di patogeno.

Nell'ambito, invece, dei metaboliti prodotti dal ceppo 678 di *Drechslera* spp. sono stati identificati un derivato dell'epoxycicloexenolone e la monocerina. Entrambi i composti hanno mostrato una buona capacità di inibizione della crescita dei patogeni *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Un derivato dell'epoxycicloexenolone era risultato in grado di inibire *G. graminis* var. *tritici*, *R. solani*, *P. irregulare* e *A. alternata* (Kim *et al.*, 2006), mentre la monocerina era stata già isolata da *Helminthosporium monoceras*, *F. larvarum*, *Readeriella mirabilis* e *D. ravanellii* (Scott *et al.*, 1984, Mallareddy e Rao, 1996; Aldridge e Turner, 1970).

I microrganismi studiati hanno evidenziato una buona capacità di tollerare e degradare il MtBE, di essere in grado di favorire lo sviluppo di piante di pomodoro, indurre resistenza sistemica nelle stesse e controllare gli attacchi di diversi patogeni.

I dati riportati in questo lavoro di tesi quindi aprono interessanti prospettive sulla possibilità di utilizzare microrganismi fungini e batterici e/o loro derivati per la formulazione di nuovi prodotti commerciali in grado di proteggere le piante contemporaneamente sia contro la presenza di patogeni sia di sostanze di natura xenobiotica.

Tali formulati avrebbero il vantaggio di essere meno pericolosi dei pesticidi di sintesi per la salute dell'uomo e degli animali, di non avere impatto ambientale negativo, di essere bio-degradabili, ed in più di poter essere compatibili e quindi combinabili con biostimolanti già utilizzati con successo nella lotta biologica e convenzionale.

## 5 .BIBLIOGRAFIA

---

**Agrios, G.N. (1998).** Plant Pathology 4th Edition, Academic Press, London.

**Aldridge, D.C. and Turner, W.B. (1970).** Metabolites of *Helminthosporium monoceras*: structures of monocerin and related benzopyrans. J. Chem. SOC., (C):2598-2600.

**Alexander, M. (1999).** Biodegradation and bioremediation 2nd edn. San Diego:Academic Press.

**Almassi, F., Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J. and Sivasithamparam, K. (1991).** New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum*. J Nat Prod, 54:396–402.

**Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer1, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25(17):3389–3402.

**Amund, O.O. (1996).** Utilization and degrading of an ester based lubricant by *Acinetobacter lwoffii*. Biodegradation, 7:91-95.

**Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W. and Michaelis, W. (2000).** Naphtalene degradation and incorporation of naphtalene derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. Applied and Environmental Microbiology, 66:518-523.

**Atlas, R.M. (1981).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiol. Rev., 45:108-209.

**Atlas, R.M. and Bartha, R. (1997).** Microbial Ecology: fundamentals and applications 4th edition, cap14.

**Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. and Codón, A.C. (2004).** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7:249–260.

**Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C. and Frankenberger, W.T. (2005).** Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96:1049-1055.

**Berry, L.A., Jones, E.E. and Deacon, J.W. (1993).** Interaction of the mycoparasite *Pythium oligandrum* with other *Pythium* species. *Biocontrol Science and Technology*, 3(3):247-260.

**Bisset, J.F. (1991).** A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.*, 69:2357-2372.

**Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., Andolfi, R. and Moschetti, G. (2002).** 16S–23S rDNA Intergenic Spacer Region Polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and Nucleotide Sequence Analysis. *System. Appl. Microbiol.*, 25:520–527.

**Bloem, J., Hopkins, D.W. and Benedetti, A. (2005).** Free-living plant-beneficial microorganisms and soil quality. In *Microbiological methods for assessing soil quality*. CABI Publishing, Wallingford Oxon, UK, pp. 270-284 (eds).

**Bobylev, M.M., Bobyleva, L.I. and Strobel, G.A. (1996).** Synthesis and bioactivity of analogs of maculosin, a host-specific phytotoxin produced by *Alternaria alternata* on spotted knapweed (*Centaurea maculosa*). *J. Agric. Food Chem.*, 44:3960-3964.

**Brisbane, P.J. and Rovira, A.D. (1988).** Mechanism of inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by fluorescent *Pseudomonads*. *Plant Pathol.*, 37:104-111.

**Brozova, J. (2002)** Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science*, 38:29-35.

**Bundy, J.G., Paton, G.I. and Campbell, C.D. (2002).** Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *Journal of Applied Microbiology*, 92:276-288.

**Burge, M.N. (1988).** Fungi in biological control systems. Manchester University Press. Manchester UK, pp. 269 (eds).

**Buyens, S., Heugens, K., Poppe, J. and Hofte, M. (1996).** Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 62:865-871.

**Cain, C.C., Dongho, L., Waldo, R.H., Henry III, A.T., Casida Jr., E.J., Wani, M.C., Wall, M.E., Oberlies, N.H. and Falkinham III, J.O. (2003).** Synergistic antimicrobial activity of metabolites produced by a nonobligate bacterial predator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7):2113-2117.

**Calvet, C., Pera, J. and Barea, J.M. (1993)** Growth response of marigold (*Tagetes erecta*) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant and Soil*, 148:1-6.

**Cerniglia, C.E. (1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons *Biodegradation*, 3:351-368.

**Chen, C.M. and Murakami, T. (1971).** Recherches toxicologiques des substances métaboliques du *Fusarium nivale*. *Chem. Pharm. Bull.*, 19(7):1498-1500.

**Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z. and Yu, Z. (2008).** Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnol. Lett.*, 30:919-923.

**Chet, I. (1987).** *Trichoderma*: application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In *Innovative Approaches to Plant Disease Control (Series and Ecological and Applied Microbiology)* (eds. I. Chet). New York: J. Wiley&Sons. 137-160.

- Chet, I. and Inbar, J. (1994).** Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotechnol., 48:37-43.
- Cho, B.H., Chino, H., Tsuji, H., Kunito, T., Nagaoka, K., Otsuka, S., Yamashita, K., Matsumoto, S. and Oyaz, H. (1997).** Laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait with soil amendment materials. Chemosphere, 35(7):1599-1611.
- Colwell, R.E. and Walker, J.D. (1997).** Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. Cri. Rev. Microbiol., 5:423-445.
- Cook, R.J., (2000a).** Advances in plant health management in the 20th century. Ann. Rev. Phytopathol, 38:95-116.
- Cook, R.J., (2000b).** Biological control in sustainable agriculture. Informatore Fitopatologico, 50(3):45-48.
- Cook, R. and Baker, K. F. (1983).** The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS, St. Paul, 539.
- Danielson, R.M. and Davey, C.B. (1973).** Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. Soil. Biol. Biochem., 5:505-515.
- Davet, P. (1979).** Technique pour l'analyse des population de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. Ann. Phytopatol., 11:529-533.
- Davis, R.F., Backman, R., Rodriguez-Kabana and Kokalis-Burelle (1992).** Biological control of apple fruit disease by *Chaetomium globosum* formulations containing cellulose. Biologic. Count. 2:118-123.
- Deacon, J. W. (1976b)** Studies on *Pythium oligangrum*, an aggressive parasite of other fungi. Transactions of the British Mycological Society, 66:383–391.

**Deeb, R.A. (1999).** Aerobic biotransformation of BTEX compounds and MTBE in contaminant mixtures by enriched and pure cultures. PhD Thesis. University of California at Berkeley, Berkeley, CA.

**Deeb, R.A., Scow, K.M. and Alvarez-Cohen, L. (2000).** Aerobic MTBE biodegradation: an examination of past studies, current challenges and future research directions. *Biodegradation*, 11:171-186.

**Domenech, J., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Ramos, B. and Gutierrez-Mañero, J. (2006).** Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *BioControl*, 51:245-258.

**Duijff, B.J., Meijer, J.W., Bakker, P. and Schippers, B. (1993).** Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99:277-289.

**EFOA, (2002).** MTBE Resource Guide. Revised Version No. 2, Brussels.

**Elad, Y. (2000).** Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection*, 19:709–714.

**Elad, Y., Chet, I. and Hanis, I. (1983).** Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* – scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73:85-88.

**El-Banna, N. and Winkelmann, G. (1998).** Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *J. Appl. Microbiol.*, 85:69–78.

**Eparvier, A. and Alabouvette, C. (1994).** Use of ELISA and GUS-transformed strains to study competition between pathogenic and non pathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonization. *Biological Science and Technology*, 4:35-47.

**Evidente, A., Andolfi, A., Cimmino, A., Vurro, M., Fracchiolla, M. and Charudattan, R. (2006).** Herbicidal potential of Ophiobolins produced by *Drechslera gigantea*. J. Agric. Food Chem., 54:1779-1783.

**Eweis, J.B., Chang, D.P., Schroeder, E.D., Scow, K.M., Morton, R.L. and Caballero, R.C. (1997).** Meeting the challenge of MTBE biodegradation. In Proceedings of the 90<sup>th</sup> Annual Meeting and Exhibition of the Air and Waste Management Association, June 8-13, Toronto, Canada.

**Ezzi, M.I. and Lynch, J.M. (2002).** Cyanide catabolising enzymes in *Trichoderma* spp. Enz. Microb. Technol., 31:1042-1047.

**Ezzi, M.I., Pascual, J.A., Gould, B.J. and Lynch, J.M. (2003).** Characterization of the rhodanase enzyme in *Trichoderma* spp. Enz. Microb. Technol., 32:629-634.

**Ferreira, N.L., Malandain, C. and Fayolle-Guichard, F. (2006).** Enzymes and genes involved in the aerobic biodegradation of methyl tert-butyl ether (MTBE). Appl Microbiol Biotechnol., 72:252–262.

**Ferreira, N.L., Maciel, H., Mathis, H., Monot, F., Fayolle-Guichard, F. and Greer, C.W. (2006).** Isolation and characterization of a new *Mycobacterium austroafricanum* strain, IFP 2015, growing on MTBE. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70:358-365.

**Finneran, K.T. and Lovley, D.R. (2000).** Anaerobic degradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and *tert*-butyl alcohol (TBA). Proceedings at MTBE Biodegradation Workshop, Cincinnati, OH.

**Fogliano, V., Ballio, A., Gallo, M., Woo, S.L., Scala, F. and Lorito, M. (2002).** *Pseudomonas* lipodepsipeptides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. Mol. Plant-Microbe Interact., 15:323-333.

**Fortin, N.Y. and Deshusses, M.A. (1999a).** Treatment of methyl *tert*-butyl ether vapors in biotrickling filters. 1. Rector startup, steady-state performance, and culture characteristics. Env. Sci. Technol., 33:2980-2986.



**Fortin, N.Y. and Deshusses, M.A. (1999b).** Treatment of methyl *tert*-butyl ether vapors in biotrickling filters. 2. Analysis of the rate-limiting step and behaviour under transient conditions. *Env. Sci. Technol.*,33:2987-2991.

**Foschi, S., Brunelli, A. and Ponti, I., (1985).** *Terapia vegetale*. Ed agricole Bologna, pp. 442.

**François, A., Matis, H., Godefroy, D., Piveteau, P., Fayolle, F. and Monot, F. (2002).** Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP2012, *Env. Microbiol.*, 68:2754-2762.

**Fravel, D.R., Adams, P.B. and Potts, W.E. (1992).** Use of disease progress curves to study the effects of the biocontrol agent *Sporidesmium sclerotivorum* on lettuce drop. *Bioc. Sci. And Tech.*, 2:341-348.

**Fujiwara, Y., Kinoshita, T., Sato, H. and Kojima, I. (1984).** Biodegradation and bioconcentration of alkylethers. *Yugagaku*, 33:111-114.

**Gabriel, C.J. and Cook, R.J. (1991).** Biological control of plant pathogens. *FAO Plant Protection Bulletin*, 38:95-99.

**Gallego, J.L.R., Loredó, J., Llamas, J.F., Vázquez, F. and Sánchez, J. (2001).** Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, 12:325-335.

**Garnier, P., Auria, R., Auger, C. and Revah, S. (1999).** Cometabolic biodegradation of methyl *t*-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 51:498-503.

**Ghazali, F.M., Rahaman, R.N.Z.A., Salleh, A.B. and Basri, M. (2004).** Biodegradation of hydrocarbon in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54:61-67.

**Ghisalberti, E.L. and Sivasithamparam, K. (1991).** Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology & Biochemistry*, 23:1011-1020.

**Gordon, T.R. and Martyn, R.D. (1997).** The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35:111-128.

**Gordon, T.R. and Okamoto, D. (1992).** Population structure and the relationship between pathogenic and non pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 82:73-77.

**Grimberg, S.J. (1996).** Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a non-ionic surfactant. *Appl Environ Microbiol.*, 62:2387-2392.

**Halden, R.U. and Dwyer, D.F. (1997).** Biodegradation of dioxin-related compounds: a review. *Bioremediation Journal*, 1:11-25.

**Hanson, J.R., Ackerman, C.E. and Scow, K.M. (1999).** Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a bacterial pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:4788-4792.

**Hardison, L.K., Curry, S.S., Ciuffetti, L.M. and Hyman, M.R. (1997).** Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl *tert*-butyl ether by filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:3059-3067.

**Harman, G.E. (2000).** Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant. Dis.*, 84:377-393.

**Harman, G.E. and Bjorkman, T. (1998).** Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Kubicek CP and Harman GE (eds.), *Trichoderma and Gliocladium* Vol. II. London: Taylor and Francis, London, pp. 1-393.

**Harman, G.E. and Kubicek, C.P. (1998).** *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. II. Taylor and Francis, London.

**Harman, G.E. and Donzelli, B.G.G. (2001).** Enhancing crop performance and pest resistance with genes from biocontrol agents. In “Enhancing Biocontrol Agents and Handling Risks”. (Vurro, M., Gressel, J., Butt, T., Harman, G.E., Pilgeram, A., St.Ledger, R.J. and Nuss, D.L., Eds.), pp.114-125. IOS Press, Amsterdam.

**Harman, G.E., Latorre, B., Agosin, E., San Martin, R., Riegel, D.G., Nielsen, P.A., Tronsmo, A. and Pearson, R.C. (1996).** Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. Biological Control, 7:259–266.

**Harman, G.E., Petzoldt R., Comis, A. and Chen, J. (2004).** Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology, 94:147-153.

**Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. (2004).** *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology, 2:43-56.

**Harman, G.E., Lorito, M. and Lynch, J.M. (2004).** Uses of *Trichoderma* spp. to remediate soil and water pollution. Adv. Appl. Microbiol., 56:313-330.

**Hjeljord, L.G., Stensvand, A. and Tronsmo, A. (2000).** Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. Biol. Control, 19:149-160.

**Hornby, D. (1990).** Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens. CAB International Wallingford UK, pp. 479 (eds).

**Howell, C.R. (2003).** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease, 87:4–10.

**Howell, C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D. and Puckhaber, L.S. (2000).** Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90:248–252.

**Hyman, M., Kwon, P., Williamson, K. and O'Reilly, K. (1998).** Cometabolism of MtBE by alkane-utilizing microorganisms. In: Wickramanayake GB & Hinchey RE (Eds). *Proceedings of the First International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds*. 1:321-326. Battelle Press, Columbus, OH.

**Hyman, M. and O'Reilly, K. (1999).** Physiological and enzymatic features of MtBE-degrading bacteria. In: Alleman, B.C. and Leeson, A. (Eds.). *Proceedings of the Fifth International In situ and on-site Bioremediation symposium*, 18-21 May, Monterey, CA, Vol. 3:7-12. Battelle Press, Columbus, OH.

**Ijah, U.J.J. and Antai, S.P. (2003).** Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51:93-99.

**Jensen, H.M. and Arvin, F. (1990).** Solubility and degradability of the gasoline additive MtBE, Methyl-*tert*-butyl-ether, and gasoline compounds in water. In: Arendt, F., Hinsenveld, M and van denBrink, W.J. (Eds). *Contaminated soil '90* (pp. 445-448). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

**Juck, D., Charles, T., Whyte, L.G. and Greer, C.W. (2000).** Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 33:241-249.

**Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G. and Hain, R. (2000).** FZb24 ® *Bacillus subtilis*: Mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-nachrichten Bayer* 1/00, 1. pp: 72-93.

**Kim, H.J., Vianle, F., Ghisalberti, E.L., Worth, C.M., Sivasithamparam, K., Skelton, B.W. and White, A.H. (2006).** An antifungal and plant growth promoting metabolite from a sterile dark ectotrophic fungus. *Phytochemistry*, 67:2277-2280.

**Kloepper, J.W., Ryu, C.M. and Zhang, S. (2004).** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11):1259-1266.

**Koenigsberg, S., Sandefur, C., Mahaffey, W., Deshusses, M. and Fortin, N. (1999).** Peroxygen mediated bioremediation of MtBE. In: Alleman, B.C. and Leeson, A. (Eds.). *Proceedings of the Fifth International In situ and on-site Bioremediation symposium*, 18-21 May, Monterey, CA, Vol. 3:13-18. Battelle Press, Columbus, OH.

**Kropp, K.G., Mormile, M.R. and Suflita, J.M. (2000).** Anaerobic biodegradation of MTBE and alternative gasoline oxygenates. *Proceedings at MTBE Biodegradation Workshop*, Cincinnati, OH.

**Kubicek, C.P., Messner, R., Fritscher, C., Strauss, J. and Kubicek-Pranz, E.M. (1990).** Regulatory aspects of formation and secretion of cellulases by *Trichoderma reesei*. In: *Trichoderma reesei* cellulases: Biochemistry, genetics, physiology and applications. Kubicek et al. (eds). Royal Chem. Society, Cambridge, UK.

**Kubicek, C.P. and Harman, G.E. (1998).** *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume I, Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis Ltd., London, UK, pp.278 (eds).

**Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K. and Lorito, M. (2001).** *Trichoderma* from gene to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, 83(2):11-23.

**Lal, B. and Khanna, S. (1996).** Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter odorans*. *Journal Applied Bacteriology*. 81:355-362.

**Le Floch, G., Rey, P., Benizri, E., Benhamou, N. and Tirilly, Y. (2003).** Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant Soil*, 257:459-470.

**Le Gal, A., Dréano, Y., Gervasi, P.G. and Berthou, F. (2001).** Human cytochrome P450 2A6 is the major enzyme involved in the metabolism of three alkoxyethers used as oxyfuels. *Toxicology Letters*. 124:47-58.

**Lewis, J.A. and Papavizas, G.C. (1987).** Permeability changes in hyphae of *Rhizoctonia solani* induced by germling preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Phytopathology*, 77:699-703.

**Ligon, J.M., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N.R., Hofmann, D., Kempf, H.J. and van Pee, K.H. (2000).** Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *PestManage. Sci.*, 56:688–695.

**Lorito, M. (1998).** Chitinolytic enzymes and their genes. In *Trichoderma* and *Gliocladium*. Harman, G. E. and Kubicek, C. P., vol. 2:73-99, Taylor & Francis, London.

**Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tromso, A., Woo, S. L. and Di Pietro, A. (1993 a).** Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum* : antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83(3):302-307.

**Lorito, M. and Woo, S. L. (1998).** Advances in understanding the antifungal mechanism of *Trichoderma* and new application for biological control. In *Molecular Approaches in Biological Control*. Duffy, B., Rosenberg, U. and Defagò, G. Eds. IOBC/OILD European Foundation of Plant Pathology, 21(9):73-80.

**Lorito, M. Woo, S., Iaccarino, M. and Scala, F. (2006).** Microrganismi antagonisti. In *Microrganismi benefici per le piante*. Idelson-Gnocchi (Eds). Cap.8 pp.146-175.

**Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zang, W., Cai, Y. And Kennelley, E.D. (2001a).** Methods for removing pollutants from contaminated soil materials with a fern plant. U.S. Patent, 6:302-942.

**Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zang, W., Cai, Y. And Kennelley, E.D. (2001b).** A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, 409-597.

**Maila, M.P., Randima, P., Surridge, K., Drønen, K. and Cloete, T.E. (2005).** Evaluation of microbial diversity of different soil layers at a contaminated diesel site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55:39-44.

**Mallareddy, K. and Prahlada Rao, S. (1996).** A concise enantiospecific synthesis of analogues of monocerin. *Tetrahedron*, 52(25):8535-8544.

**Mandeel, Q. and Baker, R. (1991).** Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt on cucumber with strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 81: 462-469.

**Martienssen, M., Fabritius, H., Kukla, S., Balcke, G.U., Hasselwander, E. and Schirmer, M. (2006).** Determination of naturally occurring MTBE biodegradation by analysing metabolites and biodegradation by-products. *Journal of Contaminant Hydrology*, 87:37–53.

**Matta, A. (1996).** *Fondamenti di Patologia Vegetale*. Pàtron Editore.

**Ministero dell'Ambiente e della tutela del territorio (2003).** Strategia d'azione ambientale per lo sviluppo sostenibile in Italia. pp:1–68. Disponibile in rete su: [www.agenda21.it](http://www.agenda21.it).

**Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C. and Lal, B. (2001).** In situ bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium. *Current Microbiology*, 43:328-335.

**Mo, K., Lora, C.O., Wanken, A.F., Javanmardian, M., Yang, X. and Kulpa, C.F. (1997).** Biodegradation of Methyl *t*-butyl ether by pure bacterial cultures. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 47:69-72.

**Mohammed, N., Allaya, R.I., Nakla, G.F., Farooq, S. and Husain, T. (1996).** State of art review of bioremediation studies. *J. Environ. Sci. Health A39* 1574.

**Molla, A.H., Fakhru'l-Razi, A., Abd-Aziz, S., Hanafi, M.M., Roychoudhury, P.K. and Alam, M.Z. (2002).** A potential resource for bioconversion of domestic wastewater sludge. *Bioresour. Technol.*, 85 (3):263–272.

**Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3):695-700.

**Muñoz-Castellanos, L.M., Torres- Muñoz, J.V., Keer-Rendón, A., Manzanares-Papayanopoulos, L.I. and Nevárez-Moorillón, G.V. (2006).** Aerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether (MtBE) by pure bacterial cultures isolated from contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22:851-855.

**Namkoong, W., Hwang, E., Park, J. and Choi, J. (2002).** Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution*, 119:23-31.

**NAS. (1987).** Report of the research briefing panel on biocontrol in managed ecosystems. Washington: National Academy of Sciences.

**Nordbring-Hertz, B. and Chet, I. (1986).** Fungal lectins and agglutinins. In *Microbiol lectins and agglutinins: properties and biological activity*. Mirelman, D. ed., John Wiley & Son., 393-407.

**Obuekwe, C.O., Badrudeen, A.M., Al-Saleh, E. and. Mulder, J.L. (2005).** Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 56:197-205.

**Okeke, B.C. and Frankenberger, Jr., W.T. (2002).** Biodegradation of methyl tertiary butyl ether (MTBE) by a bacterial enrichment consortia and its monoculture isolates. *Microbiol., Res.* 158:99-106.



**Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. and Staub T. (2001).** Induced disease resistance in plants by chemicals. *Eur. J. of Plant Pathology*, 107(1):19-28.

**Otieno, W., Termorshuizen, A., Jeger, M. and Otieno, C.O. (2003).** Efficacy of soil solarization, *Trichoderma harzianum*, and coffee pulp amendment against *Armillaria* sp. *Crop Protection.*, 22:325–331.

**Øvreås, L., Jensen, S., Daae, F.L. and Torsvik, V. (1998).** Microbial communities changes in perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:2739-2742.

**Papavizas, G.C. (1985).** *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential of biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 23:23-54.

**Park, K. and Cowan, R.M. (1997).** Effects of oxygen and temperature on the biodegradation of MTBE. In. Preprints of Extended Abstracts, Proceedings of the 213<sup>th</sup> ACS National Meeting, San Francisco, CA. (37)1:421-423.

**Picard, K., Ponchet, M., Blein, J.P., Rey, P., Tirilly, Y. and Benhamou, N. (2000).** Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiology*, 124:379–395.

**Picard, K., Tirilly, Y. and Benhamou, N. (2000).** Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4305-4314.

**Radaelli, L. and Calamai, L. (2001).** *Chimica del terreno* . Piccin Ed., Padova.

**Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L. and Steiman, R. (2000).** Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*, 40:557-563.

**Reino, J.L., Guerriero, R.F., Hernández-Gala, R. and Collado, I.G. (2007).** Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev*, DOI 10.1007/s11101-006-9032-2.

**Renella, G., , Landi, L. and Nannipieri, P. (2004).** Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma*, 122 (2004) 311 – 315.

**Rosell, M., Lacorte, S. and Barceló, D. (2006).** Simultaneous determination of methyl tert-butyl ether, its degradation products and other gasoline additives in soil samples by closed-system purge-and-trap gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 1132: 28–38.

**Rosenberg, E., Gottlieb, A. and Rosenberg, M. (1983)** Inhibition of bacterial adherence to hydrocarbons and epithelial cells by emulsan. *Infect Immun.*, 39:1024-1028.

**Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S.L. and Lorito, M. (2008).** Identification of a New Biocontrol Gene in *Trichoderma atroviride*: The role of ABC Transporter Membrane Pump in the Interaction with Different Plant-Pathogenic Fungi. *MPMI* vol.22, 291-301.

**Sahai, A.S. and Manocha, M.S. (1993).** Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.*, 11:317-338.

**Salanitro, J.P., Diaz, L.A., Williams, M.P. and Wisniewski, H.L. (1994).** Isolation of a bacterial culture that degrades methyl t-butyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:2593-2596.

**Salanitro, J.P. and Wisniewski, H.L. (1996).** Observations on the biodegradation and bioremediation potential of methyl *t*-butyl ether. In *Proceedings of the 17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry*.

**Sarkhoh, N.A., Ghannoum, M.A., Ibrahim, A.S., Stretton, R.J. and Radwan, S.S. (1990).** Crude oil and hydrocarbon degrading strains of *Rhodococcus*: *Rhodococcus* strains isolated from soil and marine environments in Kuwait. *Environ. Pollut.*, 65:1-18.

**Sarkhoh, N.A., Al-Hasana, R.H., Khanafer, M. and Radwan, S.S. (1999).** Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil. *Journal of Applied Bacteriology*, 78:194-199.

**Saxena, S. and Pandey, A.K. (2001).** Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 55:395–403.

**Schneider, R.W. (1984).** Effects of nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *F. oxysporum* f.sp. *apii* and a novel use of the Lineweaver-Burk double reciprocal plot technique. *Phytopathology*, 74(6):646-653.

**Scott, J.K. (1995).** Classical biological control of plant pathogens. *Adv. Plant Pathol.*, 11:131-146.

**Scott, F.E., Simpson, T.J., Trimble, L.A. and Vederas, J.C. (1984).** Biosynthesis of monocerin. incorporation of <sup>2</sup>H-, <sup>13</sup>C-, and <sup>18</sup>O-labelled acetates by *Drechslera ravenelii*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 756-758.

**Shoresh, M., Yedidia, I. and Chet, I. (2005).** Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95:76–84.

**Silo-Suh, L.A., Lethbridge, B.J., Raffel, S.I., He, H.Y., Clardy, J. and Handelsman, J. (1994).** Biological-activities of 2 fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:2023–2030.

**Silo-Suh, L.A., Stabb, E.V., Raffel, S.J. and Handelsman, J. (1998).** Target range of Zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Curr. Micobiol.*, 37:6–11.

**Sivan, A. and Chet, I. (1989).** Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. J. Gen. Microbiol., 135:675-682.

**Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E.L. (1998).** Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In *Trichoderma* and *Gliocladium*. Harman G.E. and Kubicek C. Taylor & Francis, London P.1:139-191.

**Smith, C.A., O'Reilly, K.T. and Hyman<sup>1</sup>, M.R. (2003).** Cometabolism of Methyl tertiary Butyl Ether and Gaseous n-Alkanes by *Pseudomonas mendocina* KR-1 Grown on C5 to C8 n-Alkanes. Applied and Environmental Microbiology, 69(12):7385–7394.

**Smith, C.A., O'Reilly, K.T. and Hyman<sup>1</sup>, M.R. (2003).** Characterization of the initial reactions during the cometabolic oxidation of methyl *tert*-butyl ether by propane-grown *Mycobacterium vaccae* JOB5. Applied and Environmental Microbiology. 69(2):796–804.

**Somsamak, P., Cowan, R.M. and Haggblom M.M. (2001).** Anaerobic biotransformation of fuel oxygenates under sulphate-reducing conditions. FEMS Microbiol. Ecol., 37:259-264.

**Sorlini, C. (2005).** Da Bonifica dei siti contaminati. pp:365-389.

**Steffan, R.J., McClay, K., Vainberg, S., Condee, C.W. and Zhang, D. (1997).** Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether and *tert*- amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol., (63)11:4216-4222.

**Stierle, A.C., Cardellina II and Strobel, G.A. (1988).** Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:8008-8011.

**Stocking, A.J., Deeb, R.A., Flores, A.E., Stringfellow, W., Talley, J., Brownell, R. and Kavanaugh, M.C. (2000).** Bioremediation of MtBE: a review from a practical perspective. Biodegradation, 11:187-201.

**Suflita, I.M. and Mormile, M.R. (1993).** Anaerobic biodegradation of known and potential gasoline oxygenates in the terrestrial subsurface. *Environ. Sci. Technol.*, 27:976-978.

**Sugawara, F., Strobel, G., Strange, R.N., Siedows, J.N., Van Duyne, G.D. and Clardyvi, J. (1987).** Phytotoxins from the pathogenic fungi *Drechslera maydis* and *Drechslera sorghicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:3081-3085.

**Thomas, J.M., Ward, C.H., Raymond, R.L., Wilson, J.T. and Loehr, R.C. (1992).** Bioremediation. *Encyclopedia of Microbiology*, 41:767-775.

**U.S. EPA (1999).** Achieving Clean Air and Clean Water: the Report of the Blue Ribbon Panel on Oxygenates in Gasoline, US Government Printing Office, Washington DC, EPA 420-R-99-021.

**U.S. EPA (2001).** Summary of workshop on biodegradation of MtBE, Washington, D.C., EPA/625/R-01/001.A.

**U.S. EPA (2007).** Biopesticide registration action document for *Pythium oligandrum* DV 74. U.S. Environmental Protection Agency.

**Vallance, J., Le Floch, G., Déniel, F., Barbier, G., Lévesque, C.A. and Rey, P. (2009).** Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and Oomycete population dynamics in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14):4790-4800.

**Van Delden, C., Pesci, E.C., Pearson, J.P. and Iglewski, B.H. (1998).** Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant. *Infect Immun.*, 66:4499-4502.

**Van Den Boogert, P.H.J.F., Jager, G. and Velvis, H. (1990).** *Verticillium biguttatum*, an important mycoparasite for the control of *Rhizoctonia solani* in potato. In *Biological Control of Soil-borne Plant pathogens* D. Hornby, CAB International, pp. 77-91 (eds.).

**Van Loon, L.C., (2000).** Systemic induced resistance. See Ref., 133:521–574.

**Vannacci, G. and Gullino, M.L. (2000)** Use of biocontrol agents against soil-borne pathogens: results and limitations. *Acta Horticulturae*, 532:79-87.

**Viggiani, G. (1994).** Lotta biologica ed integrata nella difesa fitosanitaria. Ed. Liguori, Napoli, pp 517.

**Vighi, M. and Bacci, E. (1998).** Ecotossicologia. Trattato di tossicologia e terapia. UTET, Torino. pp.237.

**Vinale, F., D'Ambrosio, G., Abadi, K., Scala, F., Marra, R., Turra, D., Woo, S.L., Lorito, M. (2004).** Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. *Journal of Zhejiang. University Science*, 30:2-8.

**Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L. and Lorito, M. (2008).** *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*. 40:1-10.

**Wardle, D.A., Parkinson, D. and Waller, J.E. (1993).** Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. *Oecologia*, 94:165-172.

**Weast, R.C. (1984).** CRC Handbook of chemistry and physics, 64<sup>th</sup> edn. Boca Raton, CRC Press.

**Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991).** 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2):697-703.

**Weller, D.M. (1988).** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 26:379–407.

**Weller, D.M. and Cook, R.J. (1983).** Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent *Pseudomonads*. *Phytopathology*, 73:463-469.

**Whipps, J.M.(1997).** Developments in the biological control of soilborne plant pathogens. *Adv. Bot. Res.*, 26:1–133.

**Whipps, J.M. (1987).** Effect of media on growth and interactions between a range of soilborne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytology*, 107:127-142.

**Whipps, J.M. (2001).** Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52, Roots special issue, pp. 487-511.

**Whyte, L.G., Bourbonniere, L. and Greer, C.W. (1997).** Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphtalene (nah) catabolic pathways. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3719-3723.

**Wilhite, S.E., Lumsden, R.D. and Straney, D.C. (1994).** Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of *Pythium* damping-off. *Phytopathology*, 84:816-821.

**Willumsen, P.A. (2001).** Degradation of phenanthrene-analogue azaarenes by *Mycobacterium gilvum* strain LB307T under aerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 56:539-544.

**Woo, S. L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R. L., Kubicek, C. P., Del Sorbo, G. and Lorito, M. (1999).** Disruption of *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Molec. Plant Microbe Interac.*, 5:419-429.

**Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M. and Lorito, M, (2006).** The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96:181–185.

**Woo, S.L. and Lorito, M. (2007).** Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro M., Gressel J. (Eds.), Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands, pp. 107–130 (Chapter 6).

**Worth, C.M., (2002).** Biological activities of fungi from the roots of an Australia grass (*Neurachne alopecuroidea*). Ph.D. Thesis, University of Western Australia, pp. 1–241.

**Yedidia, I., Benhamou, N. and Chet, I. (1999).** Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied Environment Microbiology, 65:1061–1070.

**Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y. and Chet I. (2000).** Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiology Biochemistry, 38:863-873.

**Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y. and Chet I. (2003).** Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. Applied Environmental Microbiology, 69:7343-7353.

**Yeh, C.K. and Novak, I.T. (1995).** The effect of hydrogen peroxide on the degradation of methyl and ethyl *tert*-butyl ether in soils. Water Environ. Res., 67:828-834.

**Yuste, L., Corbella, M.E., Turiegano, M.J., Karlson, U., Puyet, A. and Rojo, F. (2000).** Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. FEMS Microbiological Ecology, 32:69-75.

**Zhang, C.X., Zhao, X., Jing, Y.X., Chida, T., Chen, H. and Shen, S.H. (2008).** Phenotypic and biological properties of two antagonistic *Bacillus subtilis* strains. World J. Microbiol. Biotechnol., 24:2179-2181.



## 6. RINGRAZIAMENTI

---

A termine di questo lavoro di tesi vorrei ringraziare il prof. Matteo Lorito per avermi dato la possibilità di lavorare presso il suo laboratorio, il dott. Francesco Vinale, per l'infinita pazienza e disponibilità, la dott.ssa Sheridan Woo, la dott.ssa Michelina Ruocco, la dott.ssa Roberta Marra e la dott.ssa Stefania Lanzuise per avermi permesso di svolgere con serenità questo lavoro.

Vorrei inoltre ringraziare:

la prof.essa Olimpia Pepe del Dipartimento di Scienze degli Alimenti per l'isolamento e la caratterizzazione dei ceppi batterici utilizzati in questo lavoro;

il Prof. Alberto Ritieni e la dott.ssa Anna Gaspari del Dipartimento di Scienze degli Alimenti per le analisi GC/FID;

il prof. Alessandro Piccolo del Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'ambiente e delle produzioni animali per le analisi NMR della monocerina;

i prof. Emilio Ghisalberti e Gavin Flematti della University of Western Australia per gli spettri NMR, LC/MS ed HRMS relativi all'identificazione della maculosina.

Vorrei ringraziare anche tutti i ragazzi/e con i quali ho condiviso le ore in laboratorio in questi anni: Antonio, Pasquale, Bruna, Alessia, Pasquale, Roberta & Roberta, Erminia, Mina & Maria.

Infine, un ringraziamento particolare va a tutta la mia famiglia che in questi anni mi è sempre stata vicina e a Vittoria per la sua amicizia sincera e il suo sostegno nei momenti più difficili. Grazie.